

**Caracterización molecular de *Enterobacter cloacae* complex en aislados
resistentes a carbapenémicos en ocho ciudades de Colombia.**

Presentado por:
Elsa Piedad De La Cadena Vivas

**POSTGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD DEL VALLE
SANTIAGO DE CALI
2016**

**Caracterización molecular de *Enterobacter cloacae* complex en aislados
resistentes a carbapenémicos en ocho ciudades de Colombia.**

**Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de Magister en
Ciencias Biomédicas**

**Presentado por:
Elsa Piedad De La Cadena Vivas**

**Director del trabajo de grado:
Adriana Correa. MSc, DSc**

**POSTGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD DEL VALLE
SANTIAGO DE CALI
2016**

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	3
LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS	6
Listado de figuras	6
Listado de tablas	7
GLOSARIO.....	8
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN.....	13
CAPITULO 1	15
MARCO TEORICO	15
Resistencia a los antibióticos betalactámicos.....	17
β-lactamasas	19
β-lactamasas de espectro extendido (BLEES)	20
Cefalosporinasas (AmpC)	21
Carbapenemasas.....	24
Carbapenemasas clase A.....	25
Carbapenemasas tipo KPC	25
Entorno genético del gen <i>bla_{KPC}</i>	26
Carbapenemasas clase B.....	29
Carbapenemasas clase D	31
Resistencia a carbapenémicos no asociada a carbapenemasas.....	31
Pruebas de tamizaje para la identificación de carbapenemasas.....	32
Carba NP.....	32
Otros determinantes de resistencia asociados a bacterias resistentes a carbapenémicos.	33
Resistencia a quinolonas.....	33
Vigilancia basada en epidemiológica molecular	34
Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE).....	34
Multilocus Sequence Typing (MLST)	34

<i>Enterobacter cloacae</i> complex.....	37
Resistencia a quinolonas en <i>E. cloacae</i> complex	39
MLST en <i>E. cloacae</i> complex	40
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	42
Pregunta de investigación.....	44
OBJETIVOS.....	44
Objetivo general.....	44
Objetivos específicos	44
CAPITULO 2	46
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	46
Población de estudio y muestra.....	46
Tipo de estudio	46
Diagrama de los métodos de laboratorio	47
Detección fenotípica de la presencia de carbapenemasas utilizando Carba NP	48
Caracterización de genes <i>bla</i> por PCR	49
Relación genética	50
Rep-PCR.....	50
Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE).....	51
Entorno Genético	52
S1/PFGE.....	53
CEU-I/PFGE.....	53
MLST.....	54
CONSIDERACIONES ÉTICAS	55
CAPITULO 3	56
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
Identificación de genes de resistencia en aislamientos de <i>E. cloacae</i> complex resistentes a carbapenémicos.....	56
Análisis por MLST	63
Relación filogenética por goeBURST	66
CONCLUSIONES.....	70
LIMITACIONES	71

REFERENCIAS.....	72
ANEXO	91

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

Listado de figuras

Figura 1. Mecanismos de resistencia	18
Figura 2. Clasificación de Ambler	19
Figura 3. Mecanismos de expresión de AmpC en <i>Enterobacteriaceae</i> .	23
Figura 4. Estructura del Transposon Tn4401	27
Figura 5. Secuencia de nucleótidos corriente arriba de <i>bla</i> _{KPC}	28
Figura 6. Entorno genético Tn4401 y NTE _{KPC}	30
Figura 7. GoeBURST	36
Figura 8. Estrategia Experimental	47
Figura 9. Distribución de aislamientos por ciudad.	57
Figura 10. Distribución de aislamientos por tipo de muestra.	57
Figura 11. Localización del gen <i>bla</i> _{KPC}	63
Figura 12. Análisis de <i>E. cloacae</i> por electroforesis de campos pulsados (PFGE) y su tipo de secuencia (ST).	66
Figura 13. Relación filogenética por goeBURST.	68
Figura 14. Identificación de MLST en aislados de <i>E. cloacae</i> en ocho ciudades de Colombia	69

Listado de tablas

Tabla 1.	Listado de genes <i>bla</i> y PMQR con sus cebadores.	50
Tabla 2.	Genes y secuencias de cebadores para determinar el entorno genético de <i>bla</i> _{KPC} .	52
Tabla 3.	Genes y secuencias de cebadores para determinar MLST	55
Tabla 4.	Datos demográficos y perfil de susceptibilidad	60
Tabla 5.	Tipificación molecular de aislamientos de <i>E. cloacae</i> complex	64

GLOSARIO

Clones: Aislamientos bacterianos que a pesar de haber sido cultivados de diferentes fuentes y diferente tiempo, son fenotípica y genéticamente idénticos, lo que demuestra un origen común, dentro de un periodo de tiempo determinado.

Complejo clonal: Grupo de aislamientos bacterianos con un alto grado de similaridad.

Electroforesis de campos pulsados (PFGE): Método de tipificación molecular en el cual el DNA se somete a enzimas de restricción para detectar variaciones entre los genomas de los aislamientos analizados, produciendo fragmentos que son separados en un gel de agarosa.

Fenotipo: Características genéticas que se expresan en función de un determinado ambiente.

Genoma: Es la información genética de un organismo codificada en su DNA y RNA.

Genotipo: Constitución genética de un organismo determinada por métodos moleculares.

Genes constitutivos (*Housekeeping*): Genes que codifican para enzimas involucradas en procesos metabólicos esenciales.

Intercambio genético horizontal: Trasferencia de material genético por procesos de conjugación, transformación o transducción.

Linaje: Grupo de aislamientos que muestran características similares debido a que provienen de un ancestro común.

Multilocus sequence typing (MLST): Metodología que permite identificar las variaciones alélicas de diversos genes constitutivos, que se determinan secuenciando fragmentos internos de aproximadamente 450 pares de bases.

Mutación: Se refiere a cambios en la secuencia de DNA o RNA. Estas mutaciones pueden ser puntuales cuando se observa el cambio de un nucleótido por otro. También pueden encontrarse inserciones o deleciones de uno o más nucleótidos.

Tipo de secuencia (ST): Es la denominación del perfil alélico generado por el análisis del MLST.

RESUMEN

Introducción: Las bacterias multirresistentes (MDR), entre ellas, los bacilos Gram negativos, de gran relevancia en Colombia, se han diseminado globalmente generando un problema de salud pública. El mecanismo de resistencia más prevalente en estas bacterias son la producción de enzimas, como las β -lactamasas, encontrándose que las β -lactamasas de espectro extendido (BLEES) y las carbapenemasas han llegado a ser endémicas en determinadas regiones, y su diseminación se asocia a linajes denominados clones de alto riesgo. Esto ha sido claramente definido en bacterias como *Klebsiella pneumoniae* portadoras de la enzima KPC, *Escherichia coli* portadoras de enzimas tipo CTX-M y *Pseudomonas aeruginosa* que expresan carbapenemasas tipo KPC y VIM. La rápida diseminación de estos genes de resistencia se ha asociado a la movilización de plataformas genética móviles como transposones, integrones y plásmidos.

Por otro lado, *Enterobacter cloacae* complex ha emergido como un patógeno oportunista de importancia en infecciones nosocomiales y asociado a brotes, especialmente en unidades de cuidado intensivo (UCI). Este microorganismo presenta resistencia intrínseca a cefalosporinas hasta de tercera generación y a la combinación de β -lactamasas más inhibidores de β -lactamasas debido a una enzima cromosomal denominada AmpC. Adicionalmente, presenta resistencia a otros grupos de antibióticos como las quinolonas, ampliamente utilizadas en nuestro país, generando fenotipos MDR. Debido a esta resistencia intrínseca y a que fácilmente adquiere otras, la opción terapéutica en infecciones severas para este tipo de microorganismos son los carbapenémicos. Es por esta razón, por la cual la emergencia de *E. cloacae* complex con resistencia a este grupo de antibióticos es preocupante, y es por esto que la vigilancia de los procesos de

propagación de infecciones producidas por *E. cloacae* complex, especialmente aquellos que han adquirido genes de resistencia a los carbapenémicos, asociados a los denominados clones de alto riesgo, ha tomado una gran relevancia.

Objetivo: Describir el contexto genético de aislamientos de *E. cloacae* complex con resistencia a los carbapenémicos de ocho ciudades de Colombia que permitan describir como ha sido la distribución de su estructura poblacional.

Metodología: Se seleccionaron 28 aislamientos de *E. cloacae* complex resistentes al menos a un carbapenémico de acuerdo a los puntos de corte CLSI M100S24 del 2014, del banco de cepas de CIDEIM recolectados entre los años 2009 al 2013. Por PCR y secuenciación se identificaron los genes *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, genes *qnr*, y el entorno genético de los aislamientos portadores del gen *bla_{KPC}*. Por la técnica de *Repetitive-element* (rep-PCR) y *Multilocus sequence typing* (MLST) se determinó la estructura genética de la población.

Resultados y conclusiones: Por PCR se encontró que 19/28 aislamientos portaban *bla_{KPC}*, mientras 9/28 dieron negativo para todas las carbapenemasas analizadas. El análisis del entorno genético del gen *bla_{KPC}* identificó la presencia del transposon Tn4401b en 8/19 aislamientos, mientras que los demás aislamientos tenían un entorno diferente al descrito inicialmente para este transposon. El resultado de rep-PCR identificó 15 aislamientos relacionados clonalmente distribuidos en cuatro grupos y 13 aislamientos policlonales. MLST reveló 15 diferentes tipos de secuencias (STs), siendo el ST510 el más común (10/28), así como la presencia de una variedad de STs en los demás aislados (ST249, ST54, ST200, ST98, ST711, ST27, ST63, ST414, ST512, ST264, ST88, ST171 y ST182), incluyendo un nuevo ST descrito en este estudio (ST819). Ninguno de los ST encontrados en este estudio está asociado con los denominados clones de alto riesgo identificados en otros países. En conclusión,

la resistencia a carbapenémicos en *E. cloacae* complex está en su mayoría asociado a la presencia de carbapenemasas, aunque ya se comienzan a identificar aislados resistentes a los carbapenémicos por mecanismos diferentes a la producción de carbapenemasas. En cuanto a la tipificación molecular, si bien se observó una gran diversidad de STs, ninguno de ellos pertenecía a los STs o complejos clonales asociados a la diseminación de *E. cloacae* complex previamente reportados. Sin embargo se observó que el ST510 puede estar asociado a la diseminación de aislamientos resistentes a carbapenémicos portadores de *bla*_{KPC} en algunas regiones de Colombia.

Palabras claves: *Enterobacter cloacae* complex, clones de alto riesgo, resistencia a carbapenémicos, caracterización molecular.

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana ha sido considerada como una amenaza para la salud pública a nivel mundial. Es así que entidades como la Organización Mundial de la Salud y el Centro para el Control de las Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) han declarado la lucha contra la resistencia bacteriana como una de sus prioridades (1). Se estima que millones de personas se infectan cada año en el mundo con microorganismos resistentes a múltiples antibióticos (MDR), elevando las tasas de morbilidad y mortalidad. Dentro de estos se destaca la resistencia de bacilos Gram negativos a los carbapenémicos, los betalactámicos de más amplio espectro, y uno de los últimos recursos terapéuticos en pacientes gravemente enfermos (2).

A pesar de los esfuerzos que se han realizado para contener el aumento en la resistencia bacteriana, los resultados no son los esperados. Estudios como los del “*European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group*” realizados en 39 países de Europa han demostrado que la resistencia a carbapenémicos va en aumento; especialmente en aislamientos de *Enterobacteriaceae* portadoras de enzimas como KPC, NDM y VIM; algunos de ellos asociados a brotes (3). Resultados del estudio SENTRY llevado a cabo en Europa, Asia y los Estados Unidos en los años 2009 al 2011 mostraron una prevalencia de la resistencia a carbapenémicos del 2% al 7% en unidades de cuidado intensivo, en países como Grecia e Italia, considerados endémicos para KPC y VIM, las tasas de resistencia fueron más altas, reportándose una prevalencia superior al 25% especialmente en *K. pneumoniae* (4). La diseminación global de estas bacterias resistentes a los antibióticos se ha asociado a la diseminación exitosa de ciertos linajes o tipo de secuencia (ST). Ejemplo de esto es la diseminación de *E. coli* ST131 que ha contribuido a la

diseminación de BLEES tipo CTX-M-15 y *K. pneumoniae* ST258 el cual está implicado en la diseminación de carbapenemasas tipo KPC (5).

Debido al aumento en las tasas de resistencia, y la rápida diseminación de estos mecanismos es importante implementar programas de vigilancia que nos permitan reconocer aislamientos que puedan estar relacionados y que facilitan la diseminación de genes de resistencia. Es por esto, que la epidemiología molecular se ha convertido en una herramienta esencial que nos permite caracterizar genotípicamente estos aislamientos. Esto puede ser utilizado para dilucidar las fuentes de infección o las vías de diseminación, datos muy importantes a la hora de implementar medidas de contención (6). La recolección, análisis e interpretación de estos datos ayudan a detectar tempranamente la presencia de patógenos muy similares, que pueden ser una alerta temprana de diseminación (7).

CAPITULO 1

MARCO TEORICO

Las bacterias pueden adquirir mecanismos de resistencia a diversas clases de antibióticos. Esta resistencia se puede deber a mutaciones en su genoma o a la adquisición por transferencia horizontal de elementos genéticos móviles que portan, no solo genes de resistencia, sino también genes de virulencia (8). En el caso de los bacilos Gram negativos esta resistencia se debe tanto a mecanismos enzimáticos, como no enzimáticos (9). Estos mecanismos pueden dividirse en cuatro grupos (ver figura 1).

A. Bombas de expulsión

Son proteínas transmembranales que expulsan hacia el exterior de la célula diversos metabolitos, incluyendo antibióticos y evitando de esta forma que lleguen a su sitio blanco (10). Estas bombas pueden ser específicas para un antibiótico, o pueden ser inespecíficas, produciendo una resistencia cruzada a múltiples antibióticos. Las bombas de expulsión se clasifican en seis familias: ABC (*ATP binding cassette*), MF (*major facilitator*), MATE (*multidrug and toxic efflux*), RND (*resistance nodulation division*), SMR (*small multidrug resistance*) y DMT (*drug/metabolite transporter superfamily*), siendo las RND las más frecuentes en *Enterobacteriaceae* (11). Este mecanismo de resistencia es muy eficiente en bacilos Gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa*, incrementando considerablemente la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antibiótico; pero no produce el mismo efecto en *Enterobacteriaceae*, donde debe

estar acompañado de otro mecanismo de resistencia para incrementar la CIM hasta llegar a ser resistente (12).

B. Impermeabilidad de membrana

Las porinas son canales proteicos en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que regulan el ingreso de sustancias hidrofílicas al interior de la célula, incluyendo los antibióticos. Mutaciones en los genes que codifican para estas porinas afectan su expresión, disminuyendo la permeabilidad de las mismas, lo cual produce cierto grado de resistencia. Al igual que con las bombas de expulsión este mecanismo de resistencia es importante en bacilos Gram negativos no fermentadores, donde pueden elevar considerablemente la CIM. En el caso de las *Enterobacteriaceae* pueden llegar a producir resistencia cuando se unen a otro mecanismo de resistencia (13).

C. Modificación del sitio blanco

Las mutaciones a nivel del sitio blanco disminuyen la afinidad del antibiótico por el mismo, permitiéndole a la bacteria evadir la acción del antibiótico y sobrevivir. En el caso de los aminoglucósidos, las mutaciones se generan a nivel del ribosoma (14), mientras que para los betalactámicos las mutaciones se generan a nivel de las proteínas unidoras de penicilinas (PBP). Este mecanismo de resistencia es más importante en bacterias Gram positivas o en familias de antibióticos como las quinolonas (9).

D. Producción de enzimas

Las bacterias producen enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar diversos antibióticos y conferir resistencia. En el caso de los aminoglucósidos, la bacteria produce enzimas modificadoras de aminoglucósidos que alteran estos antibióticos mediante tres mecanismos: acetilación (AAC), fosforilación (APH) y adenilación (ANT) (14). En cuanto a los betalactámicos, el mecanismo de resistencia más

importante es la producción de β -lactamasas. Estas enzimas son capaces de romper el anillo betalactámico e inactivar la acción del antibiótico, confiriéndole resistencia a las distintas clases de antibióticos betalactámicos, dependiendo del espectro de acción de la enzima (15).

Resistencia a los antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos son una de las clases más utilizadas en la práctica clínica por su amplio espectro y pocos efectos colaterales (16). Esta clase de antibióticos inhibe la formación de la pared celular; estructura compuesta por peptidoglucano, que está formado por cadenas alternadas de pentapéptidos de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. Por la acción de enzimas transpeptidasas, también denominadas proteínas unidoras de penicilinas o PBP; los pentapeptidos se convierten en tetrapeptidos que se enlazan entre sí formando la estructura del peptidoglucano. Los antibióticos betalactámicos se unen a las PBPs impidiendo la síntesis del peptidoglucano por inhibición competitiva, lo que lleva a la muerte celular (16).

Las *Enterobacteriaceae* con excepción de *Proteus mirabilis* y *Salmonella* spp portan una β -lactamasa natural que les confiere algún grado de resistencia a los betalactámicos (17). *E. coli* y *Shigella* spp., portan una AmpC cromosomal que se expresa a tan bajo nivel que fenotípicamente se observan sensibles; En el caso de *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Citrobacter freundii* producen una penicilinasa que las hace naturalmente resistente a aminopenicilinas. Existe también un grupo de *Enterobacteriaceae* portadoras de una cefalosporinasa cromosomal inducible denominada AmpC; que les confiere resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera (C1G) y segunda generación (C2G);

cefoxitin e inhibidores de β -lactamasas. Sin embargo el uso de antibióticos betalactámicos de amplio espectro inducen la hiper-expresión de AmpC, llegando a presentar resistencia a las cefalosporinas de tercera generación (C3G), sin llegar a afectar a las de cuarta generación, ni los carbapenémicos. A este grupo pertenecen *E. cloacae* complex, *Serratia marcescens*, *C. freundii*, *Morganella morganii* y *Providencia* spp (17).

Estos mecanismos constitutivos les han permitido a este grupo de bacterias evadir la acción de algunas clases de antibióticos. De igual manera han desarrollado la capacidad de adquirir genes de resistencia que codifican para la producción de enzimas, como es el caso de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEES), AmpC plasmídica y carbapenemasas generando una mayor resistencia (18).

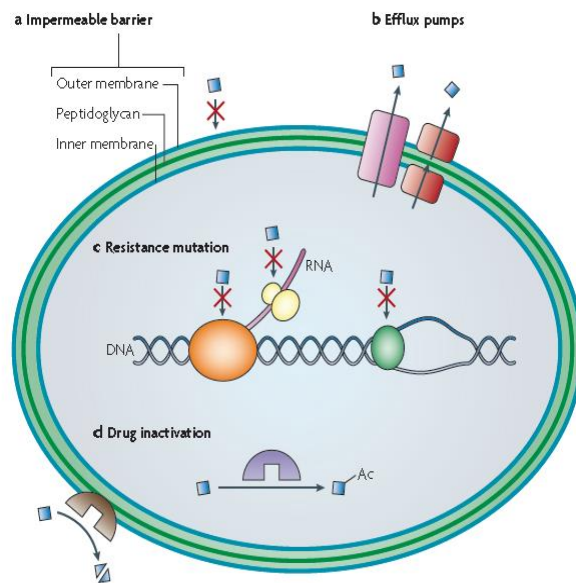


Figura 1. Mecanismos de resistencia.

- a. Impermeabilidad de membrana b. Bombas de expulsión
- c. Modificación del sitio blanco. d. Enzimático

Tomado de Nature Reviews Microbiology volume 8- April 2010

β-lactamasas

Como se mencionó anteriormente, el principal mecanismo de resistencia a los betalactámicos en *Enterobacteriaceae* es la producción de enzimas denominadas β-lactamasas. A la fecha existen más de 1500 β-lactamasas, lo que lo convierte en uno de los grupos más numeroso (<http://www.lahey.org/studies/>). Las β-lactamasas se han clasificado de acuerdo a dos esquemas, la clasificación molecular de Ambler y la clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medieros; siendo la de Ambler la más utilizada debido a su simplicidad. La clasificación de Ambler separa estas enzimas en cuatro grupos: clase A, C y D que tienen en su sitio activo una serina; y la clase B que tiene zinc (ver figura 2).

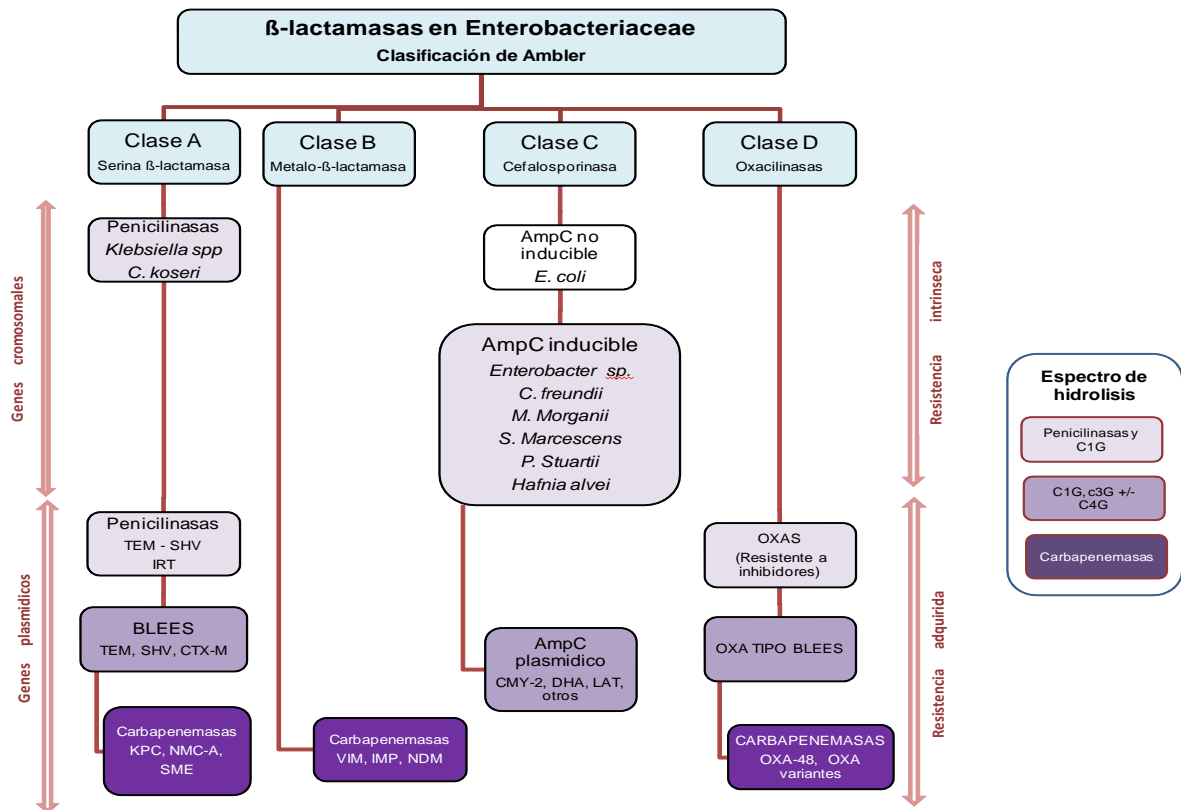


Figura 2. Clasificación de Ambler.

Tomado de Ruppé et al. Ann. Intensive Care (2015) 5:21.

β -lactamasas de espectro extendido (BLEES)

Las BLEES son enzimas que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas hasta de tercera generación; excepto cefamicinas, betalactámicos más inhibidores de β -lactamasas y carbapenémicos (19). Las primeras BLEES se reportaron en 1983, a la fecha se conocen diversas familias, pero las más prevalentes en todo el mundo son *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} que pertenecen a la clase A (20). En un estudio llevado a cabo en varios países se encontró que el porcentaje de BLEES en *K. pneumoniae* fue más alto en América Latina (45%) y Europa (23%); y más bajo en los Estados Unidos y Canadá con un promedio cercano al 8% y 5% respectivamente. Mientras que en *E. coli*, fue de 9% en América Latina, 5% en Europa y aproximadamente del 4% en Estados Unidos y Canadá (21).

Dentro de las BLEES las más importantes son las de tipo CTX-M que se han diseminado en todo el mundo. La familia de las CTX-M se divide en cinco grandes grupos de acuerdo a su homología (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25). Se conocen más de 40 variantes siendo las más comunes CTX-M-15, CTX-M-14, CTX-M-3 y CTX-M-2 (22). Se destaca dentro del grupo 1 la variedad CTX-M-15 pertenecientes al ST131, el cual se ha asociado a la diseminación de *E. coli* resistente a las cefalosporinas, y que se considera un clon de alto riesgo (23). La expansión de CTX-M en *Enterobacteriaceae* ha sido grande en el sureste asiático y el Mediterráneo; donde se estima que la tasa de portadores fecales está en el 60% y 30% respectivamente (24). Un estudio realizado por Villegas y col., en el 2008 encontró una alta prevalencia de CTX-M-2, CTX-M-12 y CTX-M-9 en *Enterobacteriaceae* en Sur América (25). En el caso de Colombia se ha reportado una prevalencia de CTX-M-15 en *E. coli* productoras de infecciones urinarias en la comunidad, asociadas al ST131 y ST405 (26,27).

Las BLEES con frecuencia se acompañan de genes de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos, lo que convierte a estos aislamientos en MDR (28).

Cefalosporinasas (AmpC)

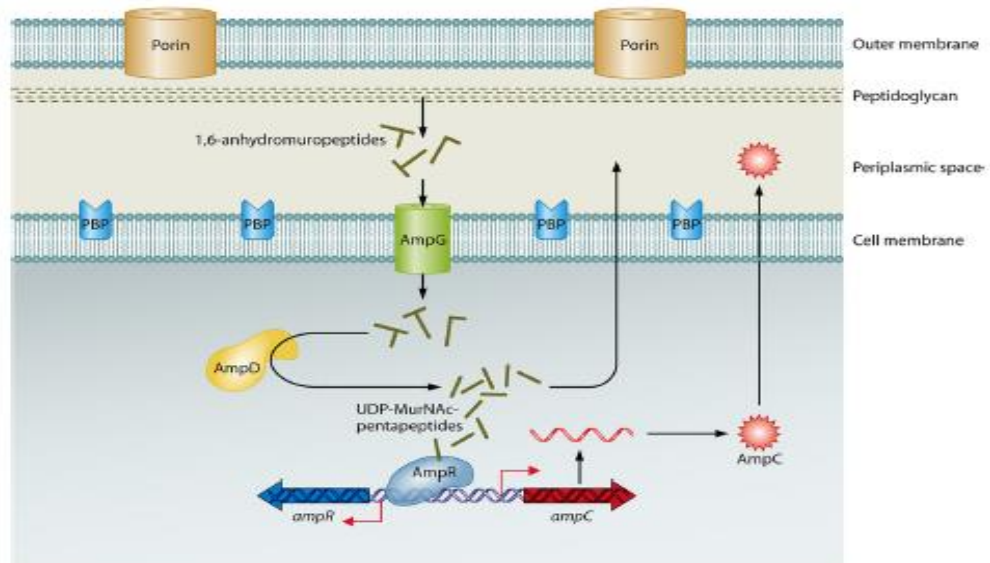
Las AmpC pueden hidrolizar penicilinas, cefalosporinas hasta de tercera generación, cefoxitin y aztreonam, pero no son activas frente a cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos. Estas enzimas que se clasifican dentro de la clase C de Ambler; se describieron inicialmente en bacterias que portaban AmpC cromosomal inducible, como *Enterobacter spp*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *M. morganii*, *Aeromonas spp*, *P. aeruginosa*, *Proteus rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Yersinia enterocolitica*, y otros (29). Esos genes cromosomales se integraron en elementos genéticos móviles, lo que les permitió transferirse a bacterias que no las portaban naturalmente, o en las que se expresa en bajo nivel; con idénticas características a las cromosomales, excepto que no son inducibles.

El sistema de producción de AmpC en el grupo de *Enterobacteriaceae*s que lo portan de forma cromosomal e inducible está regulado por un sistema de dos componentes, que también regula el reciclaje de los muropeptidos (N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico). Estos muropeptidos se liberan debido al recambio del peptidoglucano de la pared. Este peptidoglucano es un sistema biológico dinámico que está en continuo recambio, de esta forma los residuos de muropeptidos ingresan al citoplasma a través de una permeasa denominada AmpG. Una vez en el citoplasma, una parte de los muropeptidos son reciclados por el gen AmpD, y otra parte inducen la expresión basal del gen AmpR, el cual a su vez induce la expresión basal del gen AmpC. Esta expresión basal es la que le confiere su fenotipo natural de resistencia a cefalosporinas de primera y segunda generación, cefoxitin e inhibidores (ver figura 3A) (30).

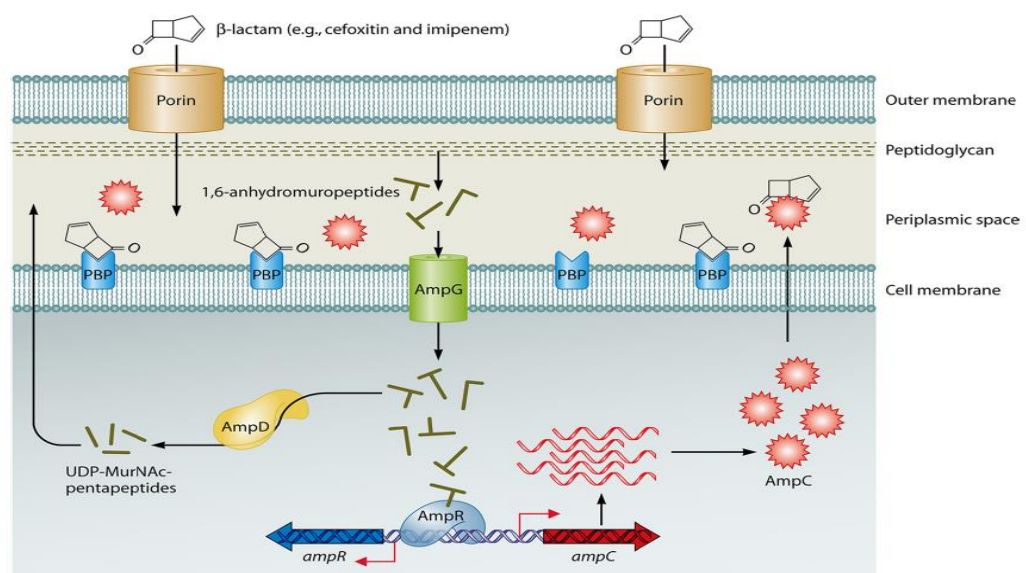
Adicionalmente este sistema es inducible. Cuando la bacteria se expone a betalactámicos se aumentan los residuos de muropeptidos por la desestabilización del peptidoglucano, ingresando una mayor cantidad de estos muropeptidos al citoplasma. Una parte de esos residuos van a ser reciclados por AmpD, pero la mayor parte de los residuos van a inducir la hiper-expresión de AmpR, que a su vez va a hiper-expresar la producción de AmpC. Este aumento en la producción de AmpC le permite a este grupo de bacterias ampliar su espectro de hidrólisis a las C3G como cefotaxime, ceftriaxona y ceftazidime; pero no tiene efecto frente a cefalosporinas zwitterionicas como cefepime o los carbapenémicos que atraviesan eficientemente la membrana celular y permanecen activos. Debido a que este fenotipo es inducible, una vez se retira el betalactámico la bacteria vuelve a su estado basal (ver figura 3B) (30). Debido a este mecanismo de inducción este tipo de microorganismos portadores de AmpC cromosomal que se muestran sensibles a las cefalosporinas de tercera generación pueden volverse resistentes tres o cuatro días después de iniciada la terapia con la cefalosporina, por lo que su uso no está indicado (31).

Un tercer fenotipo denominado de-represión se produce debido a mutaciones en cualquiera de los genes componentes del sistema (AmpD, AmpR o AmpC). Estas mutaciones hiper-expresan la cantidad de AmpC que se produce, independientemente de la presencia del betalactámico. Este microorganismo va a permanecer resistente a las cefalosporinas hasta de tercera generación (ver figura 3C) (32).

A. Expresión basal de AmpC



B. Inducción por B-lactámicos de AmpC



C. De-represión de AmpC

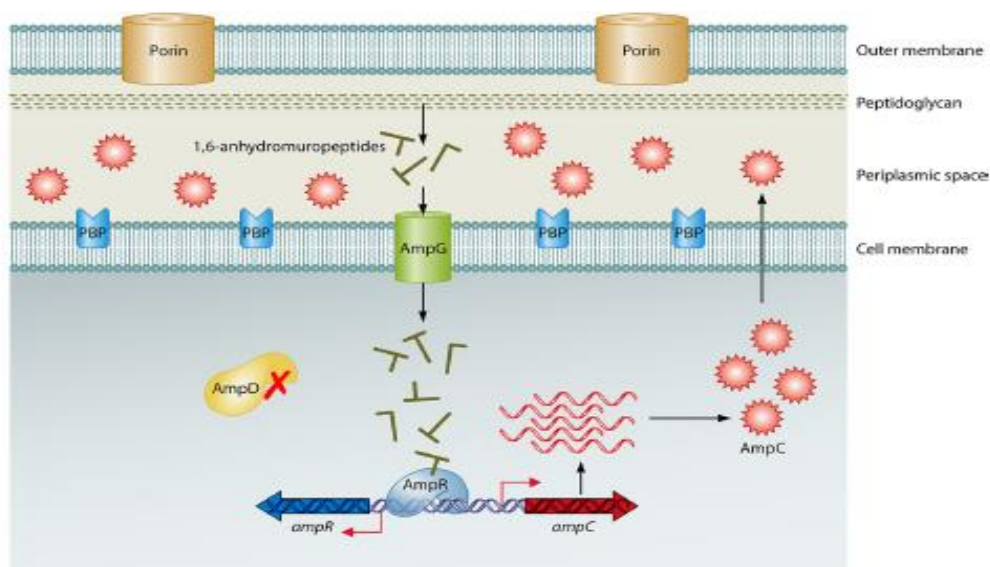


Figura 3. Mecanismos de expresión de AmpC en *Enterobacteriaceae*.

A. Expresión basal. B. Inducción por betalactámico.

C. De-represión.

Tomado de Lister PD et al. Clinical Microbiology reviews, 22:582-610. 2009.

Carbapenemasas

Cuando apareció el primer carbapenémico a finales de los 80 se pensó que se había ganado la batalla contra la resistencia bacteriana, pero las bacterias rápidamente desarrollaron resistencia a este grupo de antibióticos (33). Estas enzimas representan la familia más versátil de β -lactamasas y de más amplio espectro, que hidrolizan prácticamente todos los betalactámicos (34).

Estas enzimas se han clasificado en dos grandes grupos: serin-carbapenemasas y metalo- β -lactamasas. Las serin-carbapenemasas son de dos clases; Clase A (KPC, NMC-A/IMI, SME, GES) y Oxacilinasas de la clase D (OXA-48, OXA-24); y las Metallo- β -lactamasas de la clase B (VIM, NDM, IMP, SPM) (ver figura 2) (34,35).

Carbapenemasas clase A

Las serin-carbapenemasas de la clase A incluye genes de origen plasmidico como *K. pneumoniae* carbapenemase (bla_{KPC}) y Guiana-extended-spectrum β -lactamase (bla_{GES}); y genes cromosomales como non-metallo-carbapenemase-A (bla_{Nmc-A}), imipenem-resistant (bla_{IMI}), *S. marcescens* enzyme (bla_{SME}), *Serratia fonticola* carbapenemase (bla_{SFC}) y BIC β -lactamasas entre otras (36).

Los microorganismos que adquieren estas carbapenemasas portan plásmidos que codifican para diversas β -lactamasas, y se han asociado frecuentemente con TEM-1, SHV-11 o SHV-12 (37,38,39). Con frecuencia presentan resistencia a otras clases de antibióticos, como fluoroquinolonas, aminoglucósidos y tetraciclinas, permaneciendo susceptibles únicamente a polimixina y tigeciclina (40). Sin embargo en los últimos años han aparecido aislamientos resistentes a las polimixinas, lo que limita aún más las opciones terapéuticas (41).

Carbapenemasas tipo KPC

Una de las enzimas que más se ha diseminado a nivel mundial es la tipo KPC. Estas enzimas se aislaron por primera vez en una *K. pneumoniae* reportada en el 2001 en Carolina del Norte (USA) (42). Posterior a este reporte se ha diseminado por todos los continentes, identificándose zonas endémicas como China,

Francia, Israel, Grecia y Colombia (43). A la fecha existen 25 variantes del gen *bla*_{KPC} reportadas en todo el mundo (<http://www.lahey.org/Studies/>). Estos genes se describieron inicialmente asociados a un transposon compuesto denominado Tn4401, lo que ha facilitado su rápida diseminación. A la fecha se han descrito una variedad de entornos genéticos debido a la gran capacidad de recombinación que tienen estos transposones.

En el país se reportó por primera vez un aislamiento portador del gen *bla*_{KPC-2} en una *K. pneumoniae* aislada en la ciudad de Medellín en el 2005 (44). Posteriormente se reportó un aislamiento con el gen *bla*_{KPC-3} aislado de un paciente al que se le había realizado un trasplante; este paciente provenía de Israel, país endémico para esta enzima (45). Este último tiene un cambio de aminoácido, histidina por tirosina en la posición 272 (H272T) que lo diferencia del gen *bla*_{KPC-2}. A partir de ese momento los genes *bla*_{KPC-2} y *bla*_{KPC-3} se han diseminado prácticamente por todo el país (46).

Entorno genético del gen *bla*_{KPC}

La rápida diseminación de genes *bla*_{KPC} en *K. pneumoniae* se ha asociado a clones epidémicos como el complejo clonal (CC) 258, pero también a que se encuentra en diversidad de plásmidos, de diferentes tamaños y estructura (5).

Diversos estudios han identificado en estos plásmidos un transposon tipo Tn3 asociado con el gen de *bla*_{KPC}, denominado Tn4401 (47). Este transposon por lo general se asocia a genes de resistencia a otros betalactámicos como BLEES y determinantes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas (48). El transposon Tn4401 mide 10 Kb y está delimitado por una región de secuencias repetitivas invertidas de 39 pb, una resolvasa (*TnpR*), una transposasa (*TnpA*), dos secuencias de inserción (*ISKpn6* e *ISKpn7*), y una región intergenica de gran

variabilidad localizada entre *IstB* y el gen de KPC que da origen a siete isoformas (a, b, c, d, e, f y g) (ver figura 4) (47). La isoforma Tn4401a tiene una delección de 100 pb, Tn4401b no tiene delecciones, las otras isoformas tienen delecciones de 215, 68pb y 255 pb respectivamente. En esta región localizada corriente arriba del gen *bla_{KPC}* se han identificado tres promotores (P₁, P₂, P₃); el sitio de inicio de la transcripción (+1), y el sitio de unión de proteínas de cadena sencilla (SSB); en razón de las delecciones presentes la isoforma “a” tiene dos promotores, la isoforma b tiene los tres promotores, y la isoforma c tiene un promotor. El tipo de isoforma se ha relacionado con la expresión fenotípica de la resistencia, pero no es el único factor implicado; la variante del gen *bla_{KPC}*, el número de plásmidos y el número de copias del gen también se han asociado a la gran variabilidad en las CIMs que muestran los aislamientos portadores del gen *bla_{KPC}*, que pueden ir desde sensibles hasta mostrar altas CIMs a los betalactámicos (ver figura 5) (49).

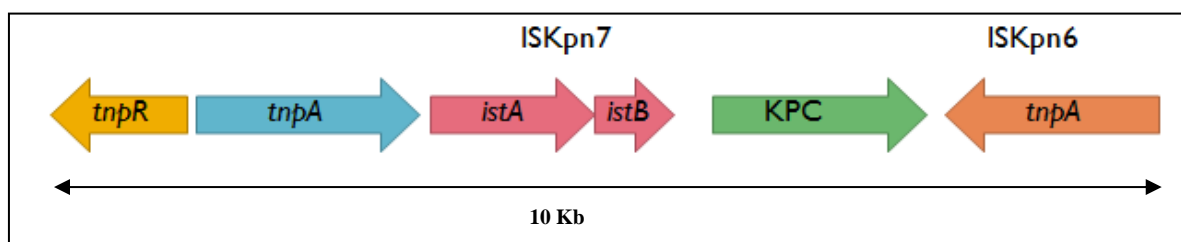


Figura 4. Estructura del Transposon Tn4401. *tnpR*: resolvasa, *tnpA*: transposasa, *istA*: secuencia de inserción A, *IstB*: secuencia de inserción B.

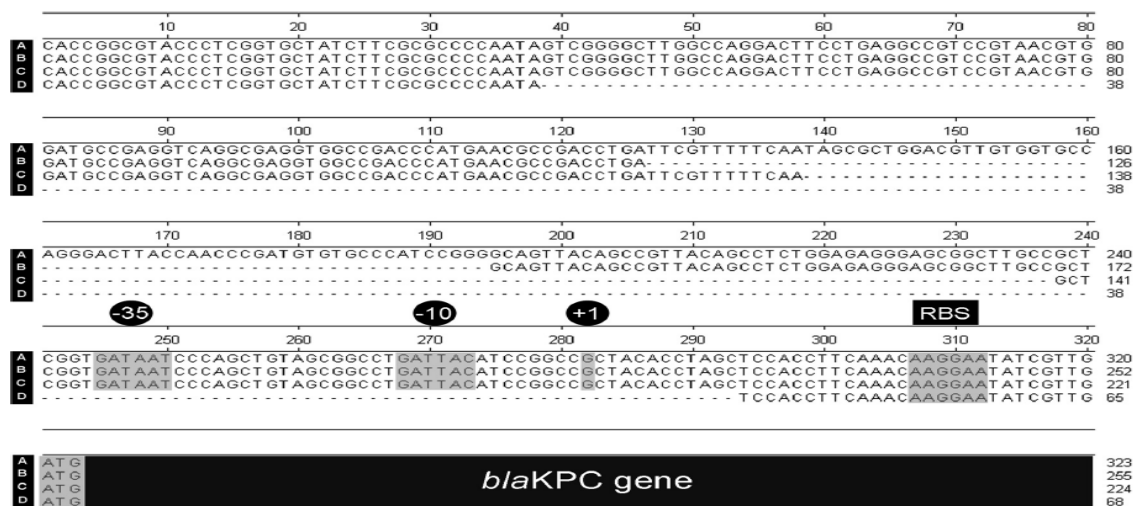


Figura 5. Secuencia de nucleótidos corriente arriba de *bla*_{KPC}, incluyendo la región del promotor (-35 y -10), origen de la transcripción (+1), codón de inicio para *bla*_{KPC} (ATG), Secuencia de aislamientos sin deleciones (A), deleción de 68 pb (B), deleción de 100 pb (C) y deleción de 255 pb (D). Tomado de Antimicrob. Agents Chemother. 2010, 54(10):4201.

Igualmente, en años recientes se ha reportado la presencia del gen *bla*_{KPC} en un entorno distinto al descrito inicialmente. Un estudio realizado en China describió un nuevo entorno genético en *Enterobacteriaceae*, donde solo una región de 2.070 pb es idéntica al Tn4401, esta región incluía el gen *bla*_{KPC-2} y una región ISKpn6-like (50). A la fecha se han descrito diferentes entornos asociados al gen *bla*_{KPC} en diversas regiones del mundo. Estos entornos son en su mayoría variantes del Tn4401 (51,52). Para facilitar y simplificar esta nomenclatura se ha recomendado recientemente denominarlas como “*bla*_{KPC}-bearing non-Tn4401 elements” (NTE_{KPC}) (53). En esta clasificación los elementos que conservan algunos elementos del Tn4401 han sido catalogados de acuerdo a los genes del entorno de *bla*_{KPC} (ver figura 6). Una secuencia de inserción ISKpn6 parcial corriente abajo del gen *bla*_{KPC} que podría haber aparecido como producto de recombinación del Tn4401 se clasifica como tipo I y II. (NTE_{KPC-I}, NTE_{KPC-II}). Estos transposones NTE_{KPC} se han asociado con mayor frecuencia a aislamientos de *K. pneumoniae* diferentes del CC258, o a otros géneros.

Carbapenemasas clase B

Este grupo está formado por más de 80 enzimas denominadas metalo- β -lactamasas (MBLs), que requieren iones de zinc para poder actuar y que por esta misma razón son inhibidas por quelantes de zinc como el EDTA (54). Estas enzimas confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos; pero permanecen susceptibles a aztreonam (55). Las MBLs incluyen genes como *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM} que son las más prevalentes. La primera metalo- β -lactamasa reportada en *Enterobacteriaceae* fue la enzima tipo IMP descrita en *S. marcescens* en 1994 (56); hasta la fecha se han descrito 52 variantes. La primera enzima tipo VIM (VIM-1) fue identificada en 1991 en un aislamiento de *P. aeruginosa* (57), posteriormente en el 2001 se reportó una variante denominada VIM-2 en un aislamiento de *S. marcescens* en Corea (58). A la fecha se han descrito 43 variantes de esta enzima, siendo la enzima VIM-2 la más prevalente. (<http://www.lahey.org/Studies/>).

Posteriormente, en el 2008 se describió una nueva enzima llamada New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM), aislada en una *K. pneumoniae*, de un paciente suizo que había sido tratado en la India. Esta enzima se ha diseminado rápidamente por todo el mundo, con la característica de conferir una elevada resistencia a todos los betalactámicos excepto aztreonam (59). Se han reportado esporádicamente otras enzimas tipo MBL restringidas a ciertas áreas geográficas como las enzimas SPM (Sao Paulo-MBL), GIM-1 (German imipenemase), SIM-1 (Seoul imipenemase), KHM-1 (Kyorin Health Science MBL), AIM-1 (Australian imipenemase), DIM-1 (Dutch imipenemase), SMB-1 (*S. marcescens* MBL), TMB-1 (Tripoli MBL) y FIM-1 (Florence imipenemase) (60,61).

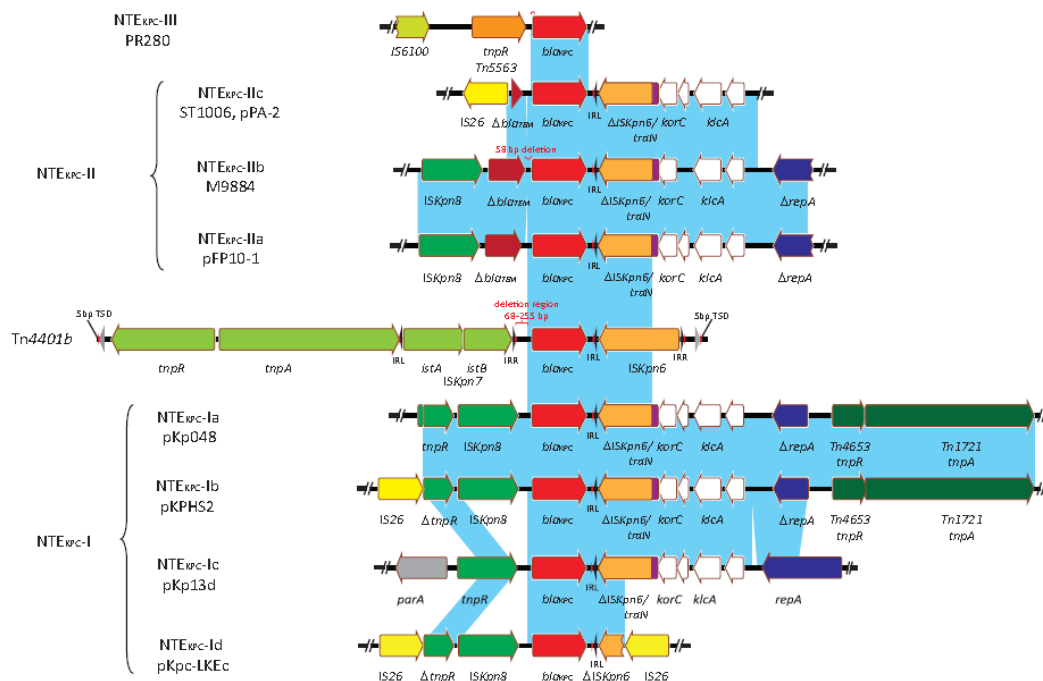


Figura 6. Entorno genético de Tn4401 y NTE_{KPC}. Basado en la secuencia de inserción corriente arriba del gen *bla*_{KPC}, NTE_{KPC} puede ser dividido en tres grupos: NTE_{KPC-I}, sin inserciones; NTE_{KPC-II}, presenta inserción de *bla*_{TEM}; y NTE_{KPC-III}, presenta inserción de un Tn5563/IS6100. Tomado de Trends in Microbiology, December 2014, Vol. 22, No. 12.

En América Latina se ha reportado una mayor prevalencia de *Enterobacteriaceae* portadoras de MBLs en México (*bla*_{VIM}) y en Guatemala (*bla*_{NDM}) (62,63). En un estudio multicéntrico en siete países de América Latina realizado por Villegas y col., se encontró una resistencia a carbapenémicos del 21% en *Enterobacteriaceae* aisladas de bacteriemias, asociada a la presencia de *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} o *bla*_{NDM}. La mayor cantidad de *bla*_{NDM} correspondía a Guatemala, *bla*_{VIM} a México y *bla*_{KPC} a Colombia (64). La primera MBL en el país en *Enterobacteriaceae* se reportó en un aislamiento de *K. pneumoniae* en la ciudad de Barranquilla; esta enzima fue identificada como una nueva variante de VIM (*bla*_{VIM-24}) (65). Al año siguiente se reportó un aislamiento que co-expresaba genes *bla*_{KPC} y *bla*_{VIM} en la misma ciudad, lo que demuestra la facilidad que tienen estas enzimas para diseminarse (66).

Carbapenemasas clase D

Las enzimas pertenecientes a esta clase se denominaron OXAS debido a su gran afinidad hacia la oxacilina, una penicilina semisintética. Posteriormente se encontraron OXAS con actividad hidrolítica hacia cefalosporinas, betalactámicos más inhibidores de β -lactamasas y carbapenémicos (67).

Las primeras carbapenemasas tipo OXAS se describieron en 1993 en un aislamiento de *Acinetobacter baumannii*, donde se reportan con mayor frecuencia (67), pero hoy en día se han identificado en diversas especies bacterianas. Las carbapenemasas de la clase D se dividen en varios grupos de acuerdo a su homología: OXA-23/27, OXA-24/40, OXA-25, OXA-26, OXA-48, OXA-51/66/69, OXA-58, OXA.143, OXA-162, OXA-181, OXA-204 y OXA-232; habiéndose descrito a la fecha más de 250 enzimas de la clase D (<http://www.lahey.org/Studies/>).

En Europa y Asia se ha reportado una alta prevalencia de *Enterobacteriaceae* portadoras del gen *bla*_{OXA-48} co-expresando enzimas tipo CTX-M-15 (68). En América los reportes de OXA-48 han sido esporádicos (69). Recientemente Vanegas y col., reportaron en Colombia una *K. oxytoca* portadora del gen *bla*_{OXA-48}. Esta bacteria se aisló en un paciente hospitalizado en la UCI, en la ciudad de Medellín, en el 2015; siendo este el primer reporte de una *Enterobacteriaceae* portadora de carbapenemasa tipo OXA en el país (70).

Resistencia a carbapenémicos no asociada a carbapenemasas

La resistencia a los carbapenémicos se puede observar por mecanismos diferentes a la producción de carbapenemasas. Se ha descrito el aumento en las CIMs de este grupo de antibióticos debido a mecanismos de hiper-expresión de

AmpC cromosomal o plasmidica debido a mutaciones en los genes reguladores de AmpC unido a alteraciones en la permeabilidad de membrana. Esta disminución en la permeabilidad es generada por mutaciones en los genes que codifican para las porinas, lo cual limita el ingreso del antibiótico al interior celular, asociándose a resistencia a los carbapenems (13).

Pruebas de tamizaje para la identificación de carbapenemasas

En los últimos años se han desarrollado numerosas estrategias para la detección de carbapenemasas (71). Sin embargo, solo existen dos pruebas aprobadas por el CLSI: El test de Hodge modificado (THM), que presenta inconvenientes como los falsos positivos con aislamientos que hiper-expresan AmpC o CTX-M más impermeabilidad de membrana, y la baja sensibilidad para detectar MBL (50%). La otra prueba es la de Carba NP, la cual fue incluida a partir del 2015 y ha demostrado tener sensibilidad y especificidad cercanas al 100% (72).

Carba NP

Esta es una prueba bioquímica para la identificación de carbapenemasas, que se basa en la hidrólisis del anillo betalactámico del imipenem por la acción de la carbapenemasa. Esta hidrólisis acidifica el medio produciendo un cambio de pH, el cual se identifica por un viraje de rojo a amarillo (73). Los estudios han demostrado que funciona muy bien con enzimas pertenecientes a la clase A y clase B; sin embargo presenta menor sensibilidad para detectar enzimas de la clase D (OXAS) (74).

Otros determinantes de resistencia asociados a bacterias resistentes a carbapenems.

Resistencia a quinolonas

Las *Enterobacteriaceae* son naturalmente susceptibles a las quinolonas. La resistencia a esta clase de antibióticos se debe principalmente a mutaciones en el sitio blanco del antibiótico, es decir los genes que codifican para la DNA-girasa y la topoisomerasa IV. También pueden adquirir resistencia debido a la adquisición de genes plasmidicos que median resistencia a quinolonas (PMQR) que son de tres tipos: i) genes que codifican para bombas de expulsión (*qepA*); ii) genes que codifican para una acetilasa (*aac(6')*-Ib-cr), y iii) genes *qnr* (75,76,77).

Los genes PMQR han sido encontrados especialmente en *E. coli*, *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp* y *Salmonella spp*. Aunque el número de aislamientos portadores de genes *qnr* ha ido en aumento la prevalencia no supera el 10%, excepto en *E. cloacae* donde se observa una prevalencia más alta (78). El primer gen *qnr* fue descubierto en 1994 en una *K. pneumoniae* en Estados Unidos, siendo *qnrB* la variante que se ha aislado con mayor frecuencia en *Enterobacteriaceae* (79). Con frecuencia se ha descrito resistencia a quinolonas en aislamientos resistentes a los carbapenémicos, esto asociado a elementos genéticos móviles complejos que confieren resistencia a otros antibióticos como aminoglucósidos, ya que portan los genes de resistencia en el mismo plásmido (80,81). Aunque los genes *qnr* no siempre elevan la CIM de las quinolonas, se han descrito plásmidos que llevan enzimas tipo BLEES, especialmente CTX-M-15 y SHV-12; y genes *qnr* simultáneamente; lo cual puede estar implicado en la diseminación de estos determinantes de resistencia en forma conjunta (82,83).

Vigilancia basada en epidemiológica molecular

Dado el aumento en las tasas de resistencia, y la diseminación de la misma a nivel global asociada a clones de alto riesgo, es imprescindible implementar programas de vigilancia molecular de los procesos de propagación de aislamientos resistentes, en especial a los carbapenémicos. El propósito de la tipificación epidemiológica molecular es diferenciar, si aislamientos en un periodo de tiempo definido provienen de la misma o diferente fuente; y determinar su ruta de transmisión. Para esto se utilizan métodos de tipificación molecular que permitan estudiar cómo ha sido la diseminación y la estructura poblacional de bacterias y otros microorganismos. La detección de grupos de microorganismos con tipos de secuencia (ST) parecidos puede ser una alerta temprana de diseminación global. Dentro de estas herramientas son fundamentales metodologías como la electroforesis de campos pulsados (PFGE) y el Multilocus sequence typing (MLST) (84).

Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE)

Esta técnica permite separar el DNA en fragmentos que son generados por el uso de una enzima de restricción, la cual reconoce y corta secuencias específicas en el DNA. El PFGE ha demostrado tener un alto poder de discriminación, pero no permite realizar comparaciones globales. Se ha utilizado más para el estudio de brotes a nivel local (7).

Multilocus Sequence Typing (MLST)

Esta es la herramienta más utilizada para estudios epidemiológicos globales y por largos periodos de tiempo; además de la identificación de los denominados clones

de alto riesgo (85). El Multilocus Sequence Typing (MLST) ha revolucionado el estudio de la dispersión de poblaciones bacterianas desde el año 2000 cuando se estandarizó la metodología, permitiendo la comparación entre aislamientos aun en diferentes áreas geográficas (85). Para el análisis de la epidemiología global donde el índice de recombinación es alto y la diversidad de clones es grande, se deben utilizar elementos genéticos que acumulen variaciones de manera lenta. Es por eso que la técnica de MLST es ideal para este propósito, debido a que analiza genes constitutivos, altamente conservados, que acumulan variaciones genéticas de manera muy lenta.

Hoy en día existen bases de datos con esquemas para diversas especies que han permitido el análisis epidemiológico y la vigilancia de patógenos, así mismo ha aportado evidencia sobre la diseminación de los clones de alto riesgo implicados en la emergencia de la resistencia bacteriana (86). Ejemplo de esto es el caso de la diseminación global de clones de alto riesgo de *E. coli* pertenecientes al ST131 portador de CTX-M-15, el cual se considera un clon exitoso asociado a aislamientos con mayor virulencia y mortalidad, reportándose altas tasas de resistencia en Europa, Norte América, Japón, Corea y África (87).

La metodología de MLST emplea un esquema universal para almacenar e interpretar datos de la secuencia de nucleótidos. Para esto se utilizan fragmentos de alelos (entre 6 a 7 locus) de aproximadamente 400 a 600 pb de longitud, de genes *constitutivos*, ya que este fue el número mínimo para obtener una buena resolución, para la identificación confiable de lo que se ha denominado la secuencia tipo (ST). La ST se obtiene cuando para cada fragmento alelico se asigna un único número en forma consecutiva, estos códigos son referidos como un perfil alelico que representa una única secuencia de nucleótidos. Adicionalmente, se puede identificar la presencia de complejos clonales (CC), el cual se define como un grupo de aislamientos con un ancestro común y sus variantes, las cuales están estrechamente relacionadas (88). Se ha definido un

complejo clonal como aquel que comparte al menos cinco loci con alguno de los miembros del complejo (89).

A la par de esta metodología se han desarrollado herramientas que permiten analizar los datos obtenidos a partir de los ST (89). Uno de ellos es el eBURST (en inglés: *Based upon related sequence types*), el cual permite describir las relaciones entre integrantes de una misma especie mediante un modelo simple de evolución, en el cual se asume la existencia de un genotipo ancestral que se diversifica debido a la acumulación de mutaciones y/o recombinaciones para producir un grupo de descendientes genéticamente relacionados, denominado complejo clonal. Esto se representa gráficamente mediante un diagrama radial en el cual el genotipo ancestral se ubica en el centro, y alrededor aislados que difieren en uno (*single locus variant* - SLV), dos (*double locus variant* - DLV) o tres alelos (*triple locus variant* TLV) de los siete incluidos en el esquema de MLST. Posteriormente apareció el goeBURST (*Global optimal eBURST*), el cual permite crear un árbol que visualiza las posibles relaciones evolutivas hasta el TLV (ver figura 7) (90).

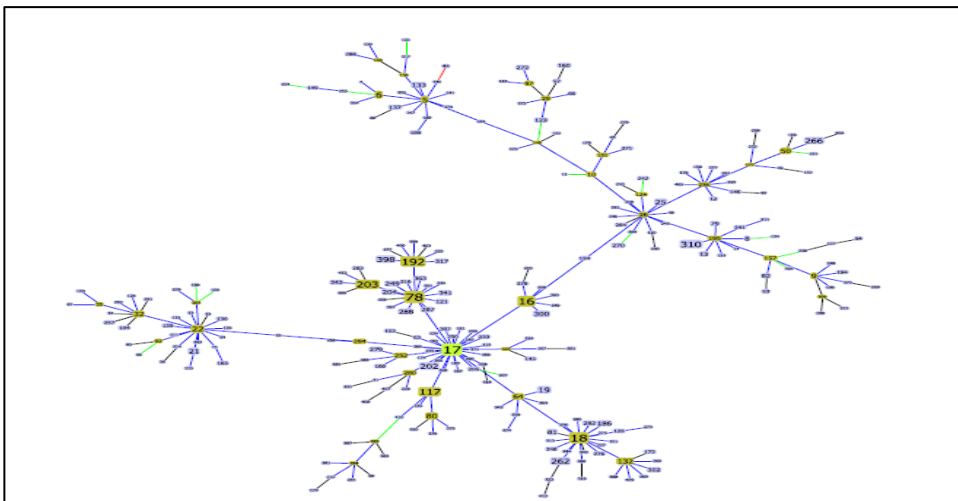


Figura 7. goeBURST. Representación del complejo clona 17 de *Enterococcus faecium* con el ST17 como aislamiento fundador. Tomado de BMC Bioinformatics 2009, 10:152

Enterobacter cloacae complex

En cuanto a *E. cloacae* complex, es un microorganismo ubicuo que sobrevive fácilmente en la tierra y el agua; además es microbiota normal del tracto gastrointestinal de humanos, por lo que con frecuencia llega a colonizarlos de forma crónica, con el riesgo de llegar a producir una infección (91). *E. cloacae* complex hace parte del denominado grupo “ESKAPE” conformado por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter* spp. Este grupo es el causante de la mayor parte de las infecciones asociadas a la atención en salud, y representa un desafío a la hora de instaurar tratamiento ya que son resistentes a prácticamente todos los antibióticos disponibles (92).

E. cloacae complex está compuesto por seis especies muy relacionadas genéticamente, que no se diferencian fácilmente por métodos bioquímicos: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* y *Enterobacter nimipressuralis*. De estos, *E. cloacae* y *E. hormaechei* son los que se asocian con más frecuencia a infección clínica (93). Esta especie presenta una cefalosporinasa (AmpC) cromosomal e inducible que puede generar tres fenotipos diferentes como ya se mencionó previamente: i) Una expresión basal de AmpC que le confiere resistencia intrínseca a amoxicilina, ácido clavulánico, cefoxitin y cefalosporinas de primera y segunda generación; con sensibilidad frente a cefalosporinas de tercera generación ii) La presencia de betalactámicos induce la hiper-expresión de AmpC debido a un fenómeno de inducción, el cual amplía su espectro de acción a las cefalosporinas de tercera generación, y iii) La de-represión de AmpC debido a mutaciones en cualquiera de los genes reguladores de la producción enzimática (AmpD, AmpR y/o AmpC) (30).

Debido a la resistencia intrínseca a las cefalosporinas que presenta esta especie, y su gran capacidad para adquirir determinantes de resistencia, es preocupante el aumento en la resistencia a los carbapenémicos. Se ha reportado una mayor mortalidad en *Enterobacter* spp productor de carbapenemasas que el observado en esta especie no productora de carbapenemasas (94).

Como se mencionó previamente, la resistencia a carbapenémicos en *E. cloacae* complex se puede deber a diversos mecanismos de resistencia. Estos antibióticos inducen la hiper-producción de AmpC, pero no son hidrolizados por esta enzima. Sin embargo aislamientos que hiper-expresan AmpC, y alteran su permeabilidad de membrana, debido a mutaciones en los genes que codifican para las porinas OmpC y OmpF, cambiando su conformación estructural pueden llegar a presentar resistencia a los carbapenémicos, donde el más afectado es ertapenem (13,95,96). La hiper-expresión de CTX-M, sumado a la impermeabilidad de membrana también se ha reportado como causante de resistencia. En un estudio llevado a cabo en China se encontró una prevalencia de 3.5% de resistencia a carbapenémicos en *E. cloacae*. La caracterización molecular de 35 de estos aislamientos identificó que la resistencia a los carbapenémicos se debía tanto a la presencia de carbapenemasas (IMP-8 e IMP-26; NDM-1 y KPC-2); como a la hiper-producción de CTX-M más impermeabilidad de membrana (97).

Sin embargo el principal mecanismo de resistencia a los carbapenémicos es la producción de carbapenemasas, los cuales se han asociado con frecuencia a brotes nosocomiales. *E. cloacae* complex portadores de *bla*_{KPC-2} y *bla*_{KPC-3} se han reportado produciendo brotes, especialmente en unidades de cuidado intensivo (UCI), en la ciudad de Nueva York, ciudad considerada endémica para carbapenemasas tipo KPC en *K. pneumoniae* (98). Igualmente se han reportado brotes por *E. cloacae* en Dakota del Norte (Estados Unidos) portadores del gen *bla*_{KPC-3} asociados al transposon Tn4401d (99).

La emergencia de *E. cloacae* complex productor de múltiples determinantes de resistencia, como enzimas tipo AmpC, BLEES, carbapenemasas y otros determinantes de resistencia como PMQR, representa un serio problema en el ambiente hospitalario. *E. cloacae* complex ha sido reportado globalmente asociado a diversas clases de carbapenemasas como responsables de la resistencia a carbapenémicos; entre ellas carbapenemasas tipo VIM en Grecia e Italia, IMP en Turquía y Taiwán; VIM al igual que OXA-48 en Italia y Corea (100,101,102,103). En el caso de NDM, que se ha diseminado rápidamente por todo el mundo desde su aparición, el CDC reportó en los Estados Unidos el primer paciente con *E. cloacae* complex portador del gen *bla*_{NDM-1}, que había recibido atención médica en la India, país endémico para esta carbapenemasa (104). De igual manera existen reportes de varios países como Singapur, China, Turquía y Canadá (97,105,106,107,108).

Los genes que codifican para BLEES y carbapenemasas por lo general están localizados en plásmidos, los cuales juegan un papel importante en la diseminación de la resistencia en esta especie, encontrándose una alta asociación entre CTX-M y carbapenemasas (109). La co-expresión de varias enzimas en este tipo de microorganismos es bastante común. En Europa se ha reportado alta prevalencia de OXA-48; a su vez en Grecia hay un predominio de VIM. En ambos casos, se ha encontrado frecuentemente CTX-M-15 asociado a esos aislamientos (110,111). En Israel a diferencia de lo reportado en varios países de Europa se ha reportado la presencia de OXA-48 co-expresando CTX-M-14 (112).

Resistencia a quinolonas en *E. cloacae* complex

A la par de la resistencia a los carbapenémicos, este complejo ha adquirido genes de resistencia a otros grupos de antibióticos como las quinolonas, limitando aún más las opciones terapéuticas. Desde que se describió la presencia de PMQR en

Enterobacter spp., se ha visto un rápido incremento en la resistencia a quinolonas asociado a mutaciones en las topoisomerasas y especialmente debido a la adquisición de genes plasmidicos (113). Se ha reportado una mayor prevalencia de genes *qnr* en *E. cloacae* complex; en aislamientos sensibles como resistentes a las quinolonas (81,114). Un estudio realizado en Taiwán demostró una prevalencia del 16.3% de resistencia a quinolonas mediadas por plásmidos (PMQR) en aislamientos de *E. cloacae*. La prevalencia de *qnr* fue más alta en productores de BLEES y metalo- β -lactamasas (39.6% y 78.6% respectivamente), frente a una prevalencia de 4.6% en aislamientos no productores de carbapenemasas (115). Un estudio realizado en Israel reportó la presencia de genes *bla*_{KPC-2} y *qnrB2* en el mismo plásmido en 14/16 aislamientos de *E. cloacae* resistentes a carbapenems y sensibles a ciprofloxacina; igualmente se reportó SHV-12 en la mayoría de los aislamientos (116). Esta mayor prevalencia de genes *qnr* en el mismo plásmido también ha sido reportada previamente (80).

MLST en *E. cloacae* complex

En el 2013 Miyoshi-Akiyama y col., desarrollaron el esquema de MLST para *E. cloacae*, utilizando siete genes constitutivos (*dnaA*, *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB* y *rpoB*) (117). A la fecha, la base de datos está en continuo crecimiento; a julio de 2016 contenía 819 STs (<https://pubmlst.org/ecloacae>), lo cual es comparativamente pequeño frente a microorganismos como *K. pneumoniae* (1525) o *E. coli* (5170).

Algunos estudios han reportado una alta diversidad de STs entre aislamientos de *E. cloacae* complex, sin embargo se han identificado algunos STs prevalentes en diversas regiones que podrían estar implicados en la diseminación de genes de resistencia. En un estudio realizado por Fernández y col., en España se reportaron 21 aislamientos de *E. cloacae* complex productores de *bla*_{OXA-48} y/o *bla*_{CTX-M-15} pertenecientes al ST66 y ST74 principalmente. Estos clones fueron

responsables de brotes en diferentes salas dentro de la misma institución, los cuales habían circulado por largos periodos de tiempo (111). Un estudio realizado por Girlich y col., en países del norte africano, mediterráneo asiático y Francia encontró igualmente una alta diversidad de STs. Este estudio reportó 44 STs en 50 aislamientos, donde el ST más prevalente fue el ST114. Estos aislamientos estaban asociados principalmente a enzimas tipo CTX-M-15; algunos de los aislamientos estaban asociados a carbapenemasas tipo VIM, OXA-48 y NDM-1 (118). Estos estudios concuerdan con lo reportado por Izdebski. Este estudio llevado a cabo con aislamientos de Europa e Israel encontró una mayor prevalencia del ST66, ST78 y ST114, asociados a CTX-M-15. Algunos de los aislamientos eran resistentes a los carbapenémicos por la producción de VIM-1 y KPC-2 (119). A diferencia de lo reportado en Europa e Israel, en China se ha reportado una mayor prevalencia de aislamientos pertenecientes al ST50 y ST124 asociados a la diseminación de CTX-M-9 y SHV-12 (120). En Taiwán Ling-Fu y col., observaron un incremento en aislamientos resistentes a carbapenémicos portadores de IMP-8 y SHV-12 pertenecientes a los ST78, ST114 y ST204 (121).

Estos estudios mostraron una mayor prevalencia de STs como el ST66, ST78, ST108 y el CC114 portadores de *bla*_{OXA-48} y *bla*_{CTX-M-15} principalmente. Estos STs y CC asociados a la diseminación de *E. cloacae* resistente a BLEES y carbapenémicos podrían tener características que los conviertan en clones de alto riesgo.

Un estudio realizado en los Estados Unidos reportó la presencia de *E. cloacae* resistentes a carbapenémicos pertenecientes a los ST93, ST171, ST252, ST253 y ST254. Estos STs eran principalmente portadores de *bla*_{KPC-2}, *bla*_{KPC-3}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-5} y *bla*_{SHV-12}. Ninguno de estos correspondía a alguno de los STs implicados en la diseminación de *E. cloacae* complex productores de β -lactamasas en Europa y Asia (122).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana ha sido declarada por la Organización Mundial de la Salud como una amenaza a la salud pública, la cual reduce las opciones terapéuticas y contribuye al incremento en la morbilidad y mortalidad (1). Debido a esta alerta en la última década se ha realizado un gran esfuerzo para controlar la diseminación de bacterias resistentes a varias clases de antibióticos denominadas multirresistentes (MDR) (123). Dentro de las estrategias se han implementado programas para el control de infecciones y manejo adecuado de antibióticos. A pesar de esto, las tasas de resistencia van en aumento en todo el mundo (124).

Colombia no es ajena a esta problemática, datos del Instituto Nacional de Salud y las redes de vigilancia de la resistencia bacteriana muestran altas tasas de resistencia a los carbapenémicos, especialmente asociada a la diseminación de *Enterobacteriaceae* portadoras del gen *bla_{KPC}*, y *P. aeruginosa* portadores de genes *bla_{KPC}* y *bla_{VIM}* (125). Un estudio de Correa y col., reportó que la diseminación de *P. aeruginosa* portadores del gen *bla_{VIM}* en el país está asociado principalmente al ST111; mientras que la diseminación del gen *bla_{KPC}* está asociado principalmente al ST235 (126). En el caso de *K. pneumoniae* portadoras del gen *bla_{KPC}*, la diseminación está asociada al complejo clonal (CC) 258 al igual que lo reportado globalmente (46).

Dentro de esta problemática destaca el grupo “ESKAPE” como responsable de la mayor parte de las infecciones asociadas a la atención en salud producidas por bacilos Gram negativos (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, y *Enterobacter* spp) (127). *E. cloacae* complex ocupa un lugar importante dentro de este grupo, habiendo emergido en los últimos años como un patógeno oportunista, especialmente en UCI. Este complejo se ubica como uno de los cinco primeros patógenos

nosocomiales Gram negativos, y el tercero dentro de las *Enterobacteriaceae* después de *E. coli* y *K. pneumoniae* (128). Este microorganismo es causante de bacteriemias, infecciones del tracto respiratorio bajo, infecciones urinarias, meningitis y otras. Con frecuencia produce brotes hospitalarios; representando un desafío para el tratamiento debido a la resistencia intrínseca a las cefalosporinas, y a que adquiere fácilmente múltiples determinantes de resistencia; dejando a los carbapenémicos como una de las pocas opciones terapéuticas. Es por esto que el incremento en la resistencia a los carbapenémicos observada en esta especie es preocupante (129). Ha llamado la atención en los últimos años, como se ha distribuido la población de *E. cloacae* complex resistentes a carbapenémicos, y si al igual que se ha visto con *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* la diseminación está asociada a la presencia de clones de alto riesgo (117).

Estudios realizados a partir del 2013 en Europa, Asia y Estados Unidos han encontrado una alta diversidad de STs en *E. cloacae* complex resistentes a betalactámicos. En su mayoría esos aislamientos son portadores de las enzimas tipo OXA-48, KPC, CTX-M-15 y SHV12 (118,119). Hacen falta más estudios para identificar la presencia de clones de alto riesgo en esta población; pero se han identificado algunos STs y CC (ST108, ST 66, CC114 y CC78) asociados a la diseminación de estos aislamientos portadores de β -lactamasas en esas regiones geográficas. Hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio que describa la estructura de la población de *E. cloacae* complex en América Latina, por lo que este estudio se convierte en el primer paso para establecer como ha sido esa distribución en un país que como Colombia presenta altas tasas de resistencia a los carbapenémicos.

Pregunta de investigación

Esos resultados nos lleva a preguntarnos si la distribución de aislamientos de *E. cloacae* complex resistentes a carbapenémicos en Colombia ha seguido un patrón local, o si está asociado a los STs implicados en la diseminación de resistencia en algunas regiones geográficas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Describir el contexto genético de aislamientos de *E. cloacae* complex con resistencia a los carbapenémicos de diferentes ciudades de Colombia que permitan establecer como ha sido la distribución de su estructura poblacional.

Objetivos específicos

1. Identificar la presencia de genes de resistencia en aislamientos de *E. cloacae* complex resistentes a carbapenémicos en ocho ciudades de Colombia.

Indicador: Presencia de β -lactamasas y PMQR en *E. cloacae* complex resistentes a carbapenémicos.

2. Identificar la estructura poblacional de *E. cloacae* complex resistentes a carbapenémicos en ocho ciudades de Colombia.

Indicador: Tipos de secuencia (ST) y complejos clonales (CC) mediante la técnica de MLST

3. Establecer si la resistencia a carbapenémicos en aislamientos de *E. cloacae* complex en ocho ciudades de Colombia está asociada a clones locales o están asociados a clones que podrían llegar a considerarse de alto riesgo descritos previamente.

Indicador: Comparar los tipos de secuencia (ST) y complejos clonales (CC) identificados mediante la técnica de MLST con los reportados a nivel mundial mediante análisis por goeBURST.

CAPITULO 2

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Población de estudio y muestra

Se seleccionaron 28 aislamientos de *E. cloacae* complex del banco de cepas del grupo de resistencia y epidemiología clínica de CIDEIM, procedentes de ocho ciudades de Colombia. Los aislamientos corresponden a los años 2009 a 2013, con resistencia por lo menos a un carbapenémico de acuerdo a los puntos de corte CLSI M100 S24, 2014 (72).

Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional descriptivo

Diagrama de los métodos de laboratorio

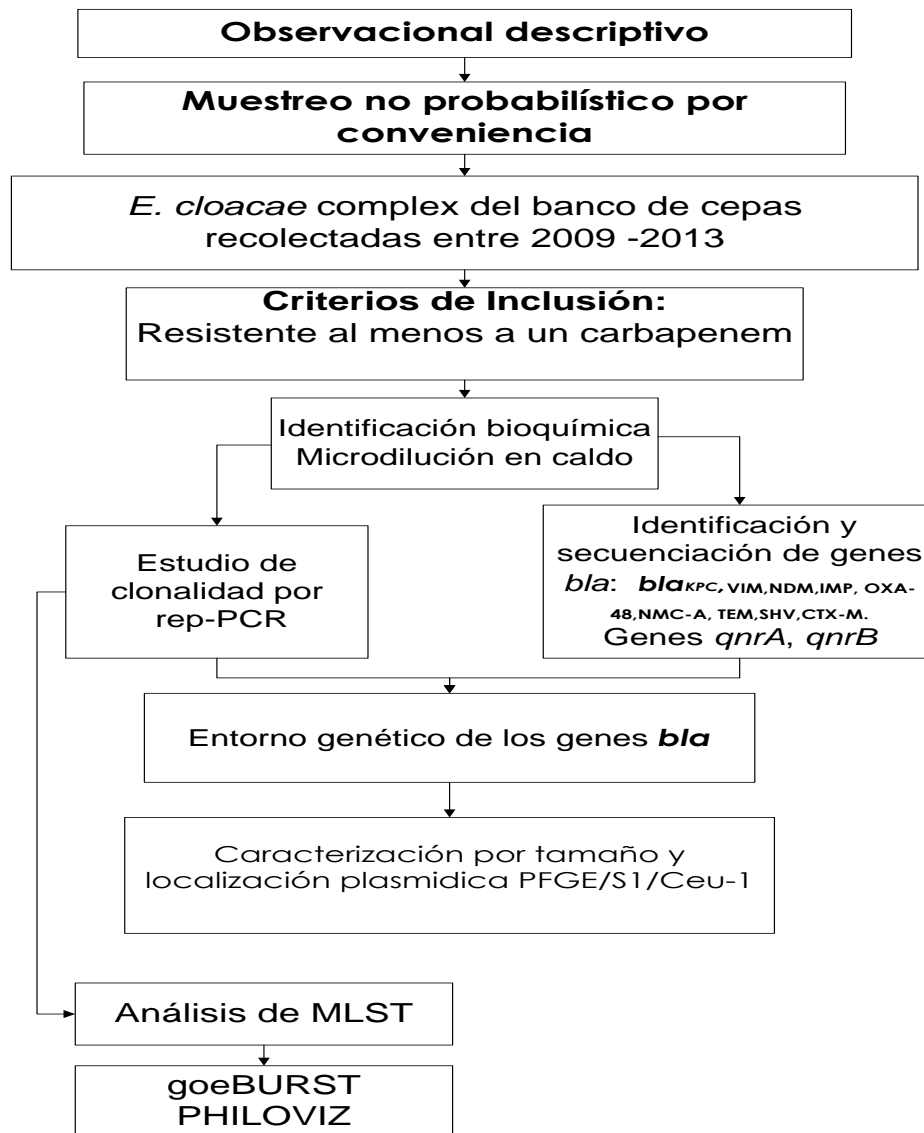


Figura 8. Estrategia experimental para la tipificación molecular de aislamientos de *E. cloacae* complex resistentes a carbapenémicos.

Se confirmó la identificación por Vitek 2 Compact (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France). Las pruebas de susceptibilidad se confirmaron utilizando el método de microdilución en caldo (*Sensititre customized panels; TREK Diagnostic Systems, Westlake, Ohio, USA*). Para determinar la susceptibilidad de polimixina se utilizó los puntos de corte de EUCAST: sensible 2 ug/ml y resistente 4 ug/ml (130); para tigeciclina se utilizaron los puntos de corte FDA: sensible 2 ug/ml, intermedio 4 ug/ml y resistente 8 ug/ml. Para el control de calidad se utilizaron cepas ATCC; *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922.

Detección fenotípica de la presencia de carbapenemasas utilizando Carba NP

La detección fenotípica de carbapenemasas se llevó a cabo mediante la prueba de Carba NP. Esta técnica se basa en la hidrólisis del imipenem por la presencia de carbapenemasas en la muestra, con producción de ácido, lo que ocasiona un viraje del indicador de pH, del color rojo a amarillo. Esta prueba se estandarizó de acuerdo al protocolo propuesto por Nordmann y col., para esto se preparó una solución A de la siguiente forma: Rojo de Fenol al 0,5% P/V (Sigma-Aldrich) suplementado con ZnSO₄ al 0.1 mM. Esta solución es estable por dos meses a temperatura de refrigeración (73).

Se repicaron los aislamientos del banco de cepas, y se verificó la pureza de los cultivos. Se tomó colonia bacteriana con una asa de 10 ul y se re-suspendió en 200 uL de *B-PERT II* (Pierce, Thermo Scientific, IL, USA). Se dió vortex por un minuto y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10.000 rpm por 5 min, se colocaron 30uL del sobrenadante en dos tubos de 1.5 ml marcados como 1 y 2.

En el momento de realizar la prueba se preparó el imipenem a una concentración de 6 mg/ml. Para esto se pesaron 6 mg de imipenem y se le agrego 1 ml de la solución A. En el tubo 1 se colocaron 100uL de solución A, y en el tubo 2, 100uL de solución A + Imipenem. Los tubos se incubaron a 37°C por dos horas.

Interpretación:

Tubo A: rojo	Tubo B: rojo	Negativo
Tubo A: rojo	Tubo B: amarillo	Positivo
Tubo A: amarillo	Tubo B: amarillo	Invalido

Caracterización de genes *bla* por PCR

Una vez confirmada la pureza, identificación y el perfil de susceptibilidad de los aislamientos, se llevó a cabo la extracción de DNA utilizando UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos para la detección de carbapenemasas tipo *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NMC-A}; y PCR en tiempo real (qPCR) para *bla*_{OXA-48}. Se identificaron genes acompañantes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}; y mediante secuenciación y análisis bioinformáticos se determinó la variante enzimática.

Adicionalmente se determinó por PCR multiplex la presencia de genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos (PMQR). Se identificaron los genes *qnrA* y *qnrB* bajo las condiciones descritas por Cattoir y col., (131). En la tabla 1 se observan los genes *bla* y PMQR analizados y los cebadores utilizados.

Relación genética

Rep-PCR

Las relaciones genéticas entre los aislamientos de *E. cloacae* se determinaron mediante el sistema Diversilab® (BioMerieux. Mercy l'Etoile, France). El DNA bacteriano se extrajo utilizando el kit de aislamiento de DNA (*MoBio UltraClean™*), seguido de amplificación por rep-PCR, la cual amplifica secuencias repetitivas en el genoma bacteriano utilizando el kit *Bacterial DL fingerprinting* de acuerdo a las instrucciones del fabricante; y separación por electroforesis usando el *chip DNA LabChip*. Los datos se analizaron con el software Diversilab® mediante el coeficiente de correlación de Pearson para el análisis del dendograma. Se consideraron clonales aislamientos con un porcentaje de similitud $\geq 98\%$.

Tabla 1. Listado de genes *bla* y PMQR con sus cebadores.

Nombre	Secuencia cebadores (5' - 3')	Sonda	Referencia
KPC F KPC R	5'-TGT CAC TGT ATC GCC GTC-3' 5'-CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC-3'		Yigit, H., A. M. et al. 2001. 45:1151-1161.
NDMF NDMR	5'- TCAGCGCAGCTTGTGCGCCAT - 3' 5'- ATGGAATTGCCCAATATTATGCACC -3'		Este estudio
VIM F (Vim forward) VIM R (Vim reverse)	5'-GTC TAT TTG ACC GCG TC-3' 5'-CTA CTC AAC GAC TGA GCG-3'		Toleman, MA. 2002. J.Antimicrob.Chemother. 50:673-679
IMP F1 IMP R1	5'- CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3' 5'- AACCAAGTTTGCCTTACCAT -3'		Senda K, Arakawa Y, Ichihama S, et al.J Clin Microbiol 1996; 34: 2909–13.
blaCTX-M C2 ctxmRSeq	5'-ATG GTT AAA AAA TCA CTG C-3' 5'-TCC GCT ATT ACA AAC CG-3'		Este estudio
SHVC F SHVC R	5'- CGCCGGGTTATTCTTATTGTGCG - 3' 5'- TCTTCCGATGCCGCCGAGTCA -3'		Sabaté et al, 2002
TEMFseq TEMRseq	5'- ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG -3' 5'- CCA ATG CTT AAT CAG TGA GG -3'		Eckert C et al. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1249–55
NMCF NMCR	5'-GCATTGATATACCTTTAGCAGAGA- 3' 5'- CGGTGATAAAATCACA CTGAGCATA - 3'		Nordmann P et al. Antimicrob Agents Chemother, May 1993, p. 939-946
QnrAm-F QnrAm-R	5'-AGAGGATTTCTCACGCCAGG-3' 5'-TGCCAGGCACAGATCTTGAC-3'		Cattoir et al. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2007) 60, 394–397
QnrBm-F QnrBm-R	5'-GGMATHGAAATTCGCCACTG-3' 5'-TTTGCYGYCGCCAGTCGAA-3'		Cattoir et al. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2007) 60, 394–397
qPCR			
OXA 48like F OXA 48likeR	5'- GCTGTATCACAATAAGTTACACGTA -3' 5'- GTTCGATTCTAGTCAGATATCCA -3'	AGTCACCATTTGGCTTCGGTCAGCAT-BHQ-2 3'	Correa A et al. Antimicrob Agents Chemother 59:2421–2425.

Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE)

A partir de un cultivo bacteriano puro se preparó una suspensión bacteriana en buffer CSB (Tris- HCL 100 mM, EDTA 100 mM) con una absorbancia de 1.2 a una longitud de onda de 610 nm. Aparte se preparó la agarosa SeaKem Gold (lonza group, U.S.A) al 1.6% en buffer TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA) utilizando una plancha de calentamiento a 56°C. Para preparar los discos de agarosa embebidos en DNA se mezcló 200ul de la suspensión bacteriana y 200 ul de la agarosa al 1.6%, y se colocaron 18 ul sobre una base de papel parafinado. Se dejó solidificar por 15 minutos a 4°C. Para el proceso de lisis bacteriana, los discos se colocaron en tubos falcón de 50mL con 10 ml de buffer de lisis (50 mMTris; 50 mM EDTA, pH 8.0; 1 mg/ml Proteinasa K) y se incubaron por dos horas a 55°C. Finalizada la incubación, se realizaron 2 lavados con agua ultra pura estéril y 4 lavadas con buffer TE manteniendo los tubos en agitación por 15 minutos a 50°C tras cada lavado. Los discos se colocaron en tubos eppendorff de 2 ml con 1 ml de buffer TE, y se almacenaron refrigerados hasta su utilización.

Para la restricción enzimática se utilizaron 5 ul de enzima de restricción XbaI (50U) (Promega, Madison, WI), 20 ul de buffer y 175 ul de agua ultra pura estéril por cada muestra. Se colocó el disco dentro de un tubo de 2.0 ml con el buffer de restricción y se incubó a 37°C por dos horas. Se preparó un gel de agarosa al 1% (LE lonza group, U.S), cada disco se colocó en el pozo del gel y posteriormente se sellaron con agarosa al 1%. La electroforesis se corrió por 22 horas a 14°C a 6 v/cm con unos tiempos de intercambio inicial de 2.16 s y final de 63.8s.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se coloreo con bromuro de etidio (0.3 μ g/ml) por 1 hora. Se utilizó el software Fingerprinting II para el análisis de la imagen, y el método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Mean*) para realizar el agrupamiento. Para la comparación se utilizó el coeficiente de DICE. Según el coeficiente de Dice porcentajes de similitud por encima del 75% estarían relacionados clonalmente, sugiriendo un ancestro común.

100%: Idénticos
 99-85%: Relacionados
 86-75%. Posiblemente relacionados
 Menor del 75%. No relacionados.

Entorno Genético

En los aislamientos de *E. cloacae* complex portadores del gen *bla_{KPC}* se identificó la variante del gen mediante PCR y secuenciación. Para caracterizar el entorno genético del gen *bla_{KPC}* se identificó el transposon Tn4401 por medio de PCR. Para identificar la isoforma se realizó PCR para la región intergenica, y se secuencio según la metodología descrita por Nash y col., (47). El listado de genes y sus cebadores utilizados para este fin, están en la tabla 2. El análisis de las secuencias se realizó mediante el programa *Codoncode Aligner*; las secuencias se compararon con secuencias conocidas usando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabla 2. Genes y secuencias de cebadores para determinar el entorno genético del gen *bla_{KPC}*.

Nombre	Secuencia primers (5' - 3')	Region amplificada
KpcA	5'-CTG TCT TGT CTC TCA TGG CC-3'	<i>bla_{KPC}</i>
KpcB	5'-CCT CGC TGT GCT TGT CAT CC-3'	
4281	5'-GGC ACG GCA AAT GAC TA-3'	<i>ISKpn6</i>
4714	5'-GAA GAT GCC AAG GTC AAT GC-3'	
3781L	5'-GCT TTC TTG CTG CCG CTG TG-3'	<i>ISKpn7</i>
3098U	5'-TGA CCC TGA GCG GCG AAA G-3'	
905L	5'-GCG ACC GGT CAG TTC CTT CT-3'	<i>tnpA</i>
816U	5'-CAC CTA CAC CAC GAC GAA CC-3'	
tnpRKPCF	5'-AGTAGCCATTCTCCCTCGGT-3'	<i>tnpR</i>
tnpRKPCR	5'-GAGGGATGCTGGGGCATATC-3'	

- Tomados de Naas et al. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Apr. 2008, p. 1257–1263

S1/PFGE

Restricción con S1 y PFGE se utilizó para estimar el tamaño y localización del plásmido portador del gen *bla_{KPC}*, seguido de hibridación con sondas específicas contra el gen *bla_{KPC}*. Para esto se prepararon moldes de agarosa embebidos del DNA bacteriano y se sometieron a digestión con nucleasa S1 (takara) (5 ul de enzimas, 2 ul de buffer y 175 ul de agua ultra pura estéril). Se incubó a 37°C por 1 hora; y finalmente se corrió la electroforesis de campos pulsados (PFGE) con las siguientes condiciones: Tiempo: 22 horas, 14°C. 6.0 V Cambio Inicial 2 seg, cambio final 28 seg.

Al finalizar la corrida se realizó un southerblot utilizando una membrana de nilón (Roche Diagnostics). El marcaje de la sonda y la detección se realizó utilizando *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I* (Roche Diagnostics), según las indicaciones del fabricante.

CEU-I/PFGE

La localización plasmídica o cromosomal del gen del *bla_{KPC}* se confirmó mediante la endonucleasa CEU-I seguida de PFGE. Para la restricción de los moldes de DNA embebidos en agarosa se preparó la enzima de la siguiente forma: Buffer 20 ul, BSA 2 ul, *I-Ceu-I* 2 ul, agua ultra pura estéril 176 ul, se incubó a 37°C durante la noche. La electroforesis se realizó utilizando las siguientes condiciones de corrida: Tiempo: 22 horas, 14°C, 6.0 V, Cambio Inicial 5s, cambio final 45s. Al finalizar la corrida se realizó un southerblot utilizando una membrana de nilón (Roche Diagnostics). El marcaje de la sonda y la detección se realizó utilizando el

KIT *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I* (Roche Diagnostics), según las indicaciones del fabricante.

MLST

Se realizó tipificación de las cepas de *E. cloacae* complex con resistencia a carbapenémicos mediante la técnica de MLST para determinar el tipo de ST circulante con base en polimorfismos presentes en genes constitutivos altamente conservados: *dnaA* (proteína para la replicación del DNA), *fusA* (factor de elongación G), *gyrB* (DNA girasa), *pyrG* (CTP sintetasa), *leuS* (leucina tRNA sintetasa), *rplB* (subunidad ribosomal 50S), *rpoB* (subunidad β de RNA polimerasa bacteriano). Se utilizaron los protocolos de amplificación, secuenciación y análisis de tipo de secuencia descritos en las bases de datos públicas <http://pubmlst.org/E.cloacae>. En la tabla 3 se pueden observar los genes y sus cebadores.

Una vez amplificado cada fragmento del gen por PCR, se corrió la electroforesis en gel de agarosa al 1%. La banda correspondiente fue cortada y purificada utilizando el kit PureLink Quick Gel Extraction (Invitrogen, USA). Se cuantificó la concentración del DNA utilizando el sistema nanodrop2000 (Thermo Scientific, Wilmington, MA) y se enviaron a Macrogen para su posterior secuenciación. Las secuencias fueron analizadas en el software *codóncode aligner* frente al alelo de referencia para cada gen, y posteriormente llevadas a la base de datos <http://pubmlst.org/E.cloacae> para determinar el alelo y ST correspondiente. El estudio de la relación filogenética se realizó por medio de goeBURST utilizando el software PHILOViZ.

Tabla 3. Genes y secuencia de cebadores para determinar MLST.

	Locus	Nombre	Secuencia primers (5' - 3')
Cebadores de amplificación	<i>dnaA</i> (proteína para la replicación del DNA)	<i>dnaA-f2</i> <i>dnaA-r</i>	5'-AYAACCCGCTGTTCTBTATGGCGGCAC-3' 5'-KGCCAGCGCCATCGCCATCTGACGCGG-3'
	<i>fusA</i> (Factor de elongación G)	<i>fusA-f2</i> <i>fusA-r2</i>	5'-TCGCGTTCGTTAACAAAATGGACCGTAT-3' 5'-TCGCCAGACGGCCCAGAGCCAGACCCAT-3'
	<i>gyrB</i> (DNA girasa)	<i>gyrB-f</i> <i>gyrB-r</i>	5'-TCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAA-3' 5'-GCAGAACCGCCGCGAGTCCCTTCCA-3'
	<i>leuS</i> (tRNA sintetasa)	<i>leuS-f2</i> <i>leuS-r</i>	5'-GATCARCTSCCGGTATCCTGCCGGAAG-3' 5'-ATAGCCGCAATTGCGGTATTGAAGGTCT-3'
	<i>pyrG</i> (CTP synthase)	<i>pyrG-f</i> <i>pyrG-r</i>	5'-AYCCBGAYGTBATTGCRCAYMAGGCGAT-3' 5'-GCRCGRATYTCVCCCTSHTCGTCCAGC-3'
	<i>rpl</i> (Subunidad ribosomal 50S)	<i>rplB-f</i> <i>rplB-r</i>	5'-GTAAACCGACATCTCCGGGTCGTCGCCA-3' 5'-ACCTTTGGTCTGAACGCCCCACGGAGTT-3'
	<i>rpoB</i> (β subunit of bacterial RNA polymerase)	<i>rpoB-f</i> <i>rpoB-r2</i>	5'-AAAAACGTATTCGTAAGGATTTTGGTAA-3' 5'-CCAGCAGATCCAGGCTCAGCTCCATGTT-3'
Cebadores de secuenciación	<i>fusA</i> (Factor de elongación G)	<i>fusA-r2-seq</i>	5'-ATCTCTTCACGYTTGTTAGCGTGCATCT-3'
	<i>gyrB</i> (DNA girasa)	<i>gyrB-r3-seq</i> <i>gyrB-f3-seq</i>	5'-GCAGAACCGCCCGCGGAGTCCCTTCC-3' 5'-AAAACCGGTACYATGGTGCCTTTCTGG-3'

CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo a la resolución 8430 del 1993, este estudio se clasifica con riesgo menor del mínimo, no contempla información de la historia clínica del paciente. Se protegerá la confidencialidad de los pacientes que proporcionaron las muestras de las que se aislaron las cepas; para esto en todos los registros y análisis se usará únicamente el código interno correspondiente a cada muestra y no su nombre o cualquier otra identificación que permita realizar una asociación entre los aislados y los pacientes.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de genes de resistencia en aislamientos de *E. cloacae* complex resistentes a carbapenémicos.

Se seleccionaron 28 aislamientos de *Enterobacter cloacae* complex del banco de cepas que presentaban resistencia al menos a un carbapenémico de acuerdo a los puntos de corte CLSI M100 S24, de ocho ciudades del país de los años 2009 al 2013 (ver figura 9).

En la tabla 4 se muestran los datos demográficos y el perfil de susceptibilidad de los 28 aislamientos. El 46% de los aislamientos clínicos se aislaron de sangre, el 25% de orina, el 11% de tejidos blandos, y el 7% de lavado bronco alveolar. El 11% de los aislamientos correspondieron a pacientes colonizados con *E. cloacae* complex resistentes a carbapenémicos (ver figura 10).

Perfil de susceptibilidad

Todos los aislamientos eran resistentes a cefalosporinas de tercera generación (cefotaxime, ceftazidime y ceftriaxona), cefepime, aztreonam y piperacilina tazobactam, incluyendo resistencia al menos un carbapenémico, lo que los define como MDR, de acuerdo a los criterios de Magiorakos y col (123). Se observó resistencia a los cuatro carbapenémicos en 16/28 (57%) aislados, resistencia a tres carbapenémicos en 3/28 (11%), resistencia a dos carbapenémicos en 4/28 (14%), y resistencia a un carbapenémico en 5/28 (18%) aislamientos. Todos los aislamientos fueron resistentes a ertapenem. Adicionalmente se observó

resistencia a ciprofloxacina en 21/28 (75%), amikacina 7/28 (25%), polimixina 2/28 (7,1%) y uno fue resistente a tigeciclina (3,6%) (Ver tabla 4). La mayoría de los aislamientos fueron susceptibles a tigeciclina y polimixina. El 46% de los aislamientos provenían de sangre, donde la tigeciclina no es activa. En estos aislamientos prácticamente la única opción terapéutica serían las polimixinas.

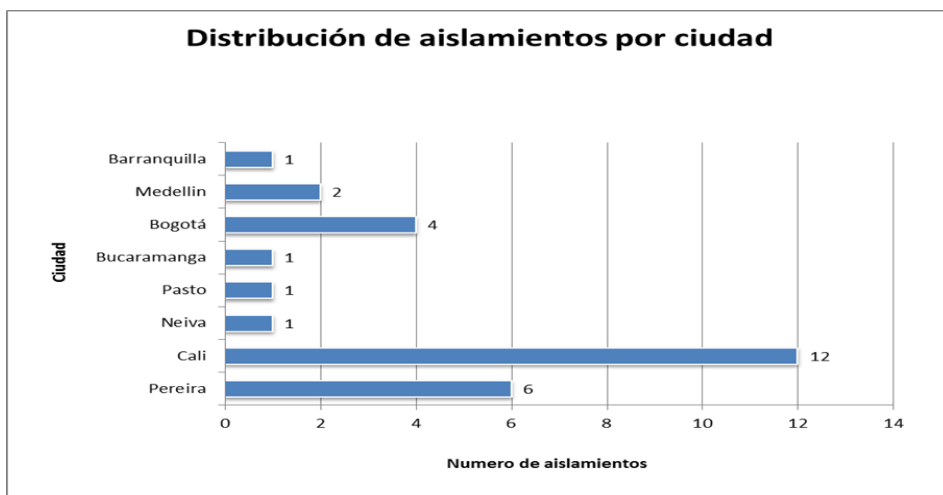


Figura 9. Distribución de aislamientos por ciudad.

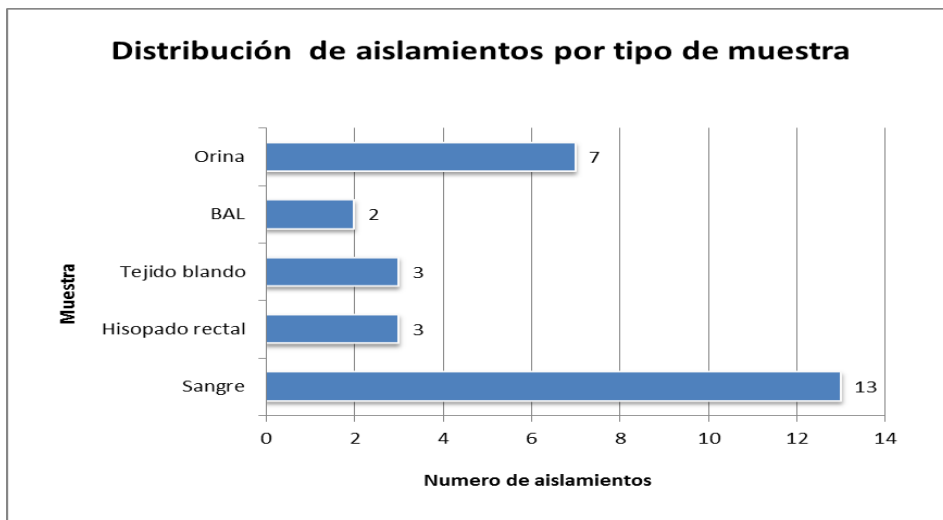


Figura 10. Distribución de aislamientos por tipo de muestra.

Detección fenotípica de la presencia de carbapenemasas utilizando Carba NP

Se realizó Carba NP a todos los aislamientos como prueba de tamizaje. 19/28 (68%) dieron positivo para la prueba de Carba NP, indicando la presencia de una carbapenemasa. El resto de los aislamientos, 9/28 (32%) tuvieron un resultado negativo, sugiriendo que la resistencia a los carbapenémicos en estos aislamientos se debe a mecanismos distintos a la presencia de carbapenemasas. A pesar de que la producción de enzimas es el principal mecanismo de resistencia en *Enterobacteriaceae*, se ha reportado un incremento en la resistencia de este complejo asociado a otros mecanismos. Es así como aislamientos portadores de AmpC como *E. cloacae* complex pueden incrementar la CIM de los carbapenémicos por hiper-expresión de AmpC sumado a impermeabilidad de membrana.

PCR para genes *bla*

Los resultados de PCR identificaron 19/28 (68%) aislamientos como positivos para el gen *bla*_{KPC}, de los cuales, 17 presentaban co-expresión de otras β -lactamasas. El resto de los aislamientos 9/28 (32%) dieron negativo para todas las carbapenemasas probadas. Estos resultados fueron congruentes con los resultados encontrados con la prueba fenotípica Carba NP. Esto demuestra que esta prueba puede ser una alternativa para el tamizaje de carbapenemasas, sobretodo en aislamientos que muestran resistencia a los carbapenémicos por mecanismos de hiper-expresión e impermeabilidad como parecen ser estos, donde se han reportado falsos positivos (132). En cuanto a la relación de la presencia de estos genes con la expresión fenotípica, las CIM fueron muy variables y no se encontraron diferencias respecto a los aislamientos portadores del gen *bla*_{KPC} frente a los que no lo tenían. Estas diferencias en la expresión fenotípica de la resistencia se puede deber a número de copias del gen, número

de plásmidos asociados a la resistencia, presencia de un promotor fuerte, entre otras.

En cuanto a la co-expresión de genes *bla*, 11/19 aislamientos con el gen *bla*_{KPC} portaban TEM-1 (39%), 3/19 (16%) CTX-M-12 y TEM-1; 2/19 (11%) portaban TEM-1 y SHV (SHV-12 y SHV-86); 1/19 (5%) tenía SHV-1. Los dos aislamientos restantes no co-expresaron otras enzimas. Por otro lado, 4/9 (44%) de los aislamientos que no portaban carbapenemasas fueron positivos para CTX-M-12 y TEM-1. 1/9 (11%) tenía únicamente CTX-M-15 y 1/9 (11%) SHV-1, 1/9 (11%) CTX-M-12, TEM-1 y SHV-12; 1/9 (11%) CTX-M-15 y TEM-1. Uno de los aislamientos no portaba ninguno de estos genes, con Carba NP negativo; lo cual nos permite inferir que la resistencia en este aislamiento puede estar asociada a hiper-expresión de la AmpC cromosomal mas impermeabilidad. Este aislamiento era resistente a ertapenem e imipenem; e intermedio para meropenem y doripenem. Estos antibióticos pueden ser más estables a la hiper-expresión de estas enzimas, y observarse susceptibles (ver tabla 5)

En Europa e Israel se ha reportado principalmente CTX-M-15 en *E. cloacae* complex con carbapenemasas, a diferencia de lo encontrado en este estudio donde CTX-M-12 es más prevalente (111). En Colombia diversos estudios muestran una diseminación de CTX-M-15 asociados a infecciones por *E. coli*, diferente a lo que se observó en *E. cloacae* donde es más prevalente CTX-M-12 (26).

Por secuenciación del gen *bla*_{KPC} en todos los aislamientos positivos, se determinó que todos pertenecían a la variante *bla*_{KPC-2}. Estos resultados difieren de lo encontrado en Estados Unidos donde se han reportado brotes producidos por *E. cloacae* complex portador del gen *bla*_{KPC-3} y *bla*_{KPC-2} (98,99). En Colombia el gen *bla*_{KPC-3} parece estar restringido a *K. pneumoniae* y no se ha diseminado en otras especies; tal como lo reportó un estudio realizado por Mojica y col., (46).

Tabla 4. Datos demográficos y perfil de susceptibilidad de *E. cloacae* complex.

No aislamiento	Año	Sala	MIC (ug/ml)														CARBA-NP
			AZT	TAZ	CRO	CTX	PTZ	FEP	ETP	IMI	MEM	DOR	CIP	AMK	POL	TGC	
1	2009	Cirugía	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128/4	16	8	4	2	2	<= 0,5	<= 8	<= 0,5	1	+
2	2009	UCI	> 32	8	8	4	> 128/4	4	4	8	4	2	<= 0,5	16	>8	<= 0,5	+
3	2009	UCI	> 32	> 16	> 16	16	> 128/4	> 32	8	16	16	16	<= 0,5	= 64	1	<= 0,5	+
4	2009	UCI	32	8	32	8	128/4	16	> 64	> 64	> 64	> 64	<= 0,5	<= 8	1	<= 0,5	+
5	2011	URG	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128/4	> 32	4	2	2	1	>8	= 64	<= 0,5	<= 0,5	+
6	2009	UCI	> 32	16	> 16	16	> 128/4	8	8	16	16	8	<= 0,5	<= 8	1	<= 0,5	+
7	2013	Hospitalización	32	> 16	> 16	> 16	128/4	32	4	2	2	1	<= 0,5	>64	2	<= 0,5	+
8	2011	Hospitalización	> 32	> 16	> 16	8	> 128/4	16	2	2	1	0.25	<= 0,5	16	>8	1	+
9	2011	Medicina Interna	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128/4	16	16	8	8	4	>8	= 64	<= 0,5	<= 0,5	+
10	2012	Hospitalización	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128/4	32	> 64	> 64	> 64	64	>8	<= 8	1	<= 0,5	+
11	2012	UCI	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128/4	> 32	> 64	64	64	32	>8	<= 8	2	1	+
12	2010	URG	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128/4	16	16	4	4	2	>8	16	1	2	+
13	2010	Medicina Interna	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128/4	16	16	4	4	1	>8	<= 8	<= 0,5	2	+
14	2010	Hospitalización	> 32	> 16	> 64	> 16	> 128/4	16	16	4	4	4	>8	<= 8	1	2	+
15	2010	UCI	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128/4	32	4	2	1	0.5	>8	16	1	1	+
16	2012	Hospitalización	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128/4	16	16	8	4	2	>8	16	1	1	+
17	2011	Cirugía	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128/4	16	8	4	4	4	>8	<= 8	2	1	+
18	2011	UCI	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128/4	32	16	4	4	1	>8	16	1	<= 0,5	+
19	2012	Hospitalización	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128/4	32	16	8	8	4	>8	16	2	1	+
20	2009	UCI	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128	8	32	4	4	2	>8	≤ 8	2	0.25	-
21	2009	Hospitalización	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128	8	32	4	4	2	> 8	16	2	2	-
22	2009	Hospitalización	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128	> 32	4	4	4	2	> 8	≤ 8	2	2	-
23	2009	Cirugía	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128	32	4	≤ 0.12	1	0.25	> 8	32	≤ 0.5	2	-
24	2009	UCI	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128	> 32	2	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	> 8	64	2	2	-
25	2011	Hospitalización	> 32	> 16	> 16	> 16	> 128	> 32	> 64	32	64	64	> 8	> 64	1	≤ 0.5	-
26	2011	Hospitalización	> 32	> 16	16	> 16	> 128	32	> 64	8	32	8	> 8	32	8	≤ 0.5	-
27	2012	Pediatría	32	16	> 16	> 16	> 128	> 32	> 64	> 64	64	32	> 8	64	1	1	-
28	2010	Cirugía	32	> 16	> 16	> 16	> 128	16	16	8	2	2	> 8	≤ 8	1	8	-

MED: Medellín, CLO: Cali, BUG: Bucaramanga, BOG: Bogotá, PER: Pereira, PAS: Pasto, NEV: Neiva, BRQ: Barranquilla. UCI, Unidad de cuidado intensivo, URG, Urgencias, AZT: aztreonam, TAZ: ceftazidime, CRO: ceftriaxona, CTX: cefotaxime, PTZ: piperacilina-tazobactam, FEP; cefepime, ETP: ertapenem, IMI: imipenem, MER: meropenem, DOR: doripenem, AK: amikacina, CIP:ciprofloxacina, POL: polimixina, TGC: tigeciclina.

La resistencia en *E. cloacae* complex ha sido en la mayoría de los casos asociada a la presencia de carbapenemasas. Similares resultados fueron encontrados en este estudio, donde el 68% de los aislamientos portaban genes *bla*_{KPC-2}. Sin embargo se observa un creciente número de aislamientos con resistencia a carbapenémicos no asociado a estas enzimas, lo que podría ser consecuencia de la presión que ejerce el uso de antibióticos, y la capacidad que tiene este complejo para hiper-expresar su enzima cromosomal (AmpC) y disminuir su permeabilidad de membrana mediante mutaciones en los genes que codifican para las porinas (133).

PCR para genes *qnrA* – *qnrB*

En cuanto a la presencia de genes *qnrA* y *qnrB*, 17/28 (61%) aislamientos portaban genes *qnr* (16 *qnrB* y 1 *qnrA*) (ver tabla 5). 15 de los aislamientos de *E. cloacae* complex co-expresaban *bla*_{KPC} y *qnrB* mostrando una mayor presencia de estos genes en aislamientos portadores del gen *bla*_{KPC-2}. En Israel, país endémico para *bla*_{KPC}, situación muy parecida a nuestro país, se ha reportado la presencia de genes *bla*_{KPC} y *qnrB* en el mismo plásmido. Al igual que lo reportado previamente encontramos un alta prevalencia de genes *qnrB*, que aunque no en todos los casos implico resistencia a quinolonas, si podría facilitar la seleccionar de cepas resistentes (80).

Análisis del entorno genético del gen *bla*_{KPC-2}

A los 19 aislamientos portadores del gen *bla*_{KPC-2} se les estudió el entorno genético mediante PCR y secuenciación. Se determinó que 8/19 aislamientos (42%) estaban asociados al transposon Tn4401; en los otros 11 (57%) aislamientos solo amplificó la región correspondiente a la *ISKpn6*, identificándolos con un entorno diferente al descrito originalmente (47). Estos

resultados son similares al fenómeno observado en *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* reportados previamente (47,52), lo que evidencia la gran variabilidad que tiene este entorno hoy en día, posiblemente debido a fenómenos de recombinación genética. Al realizar el análisis bioinformático de la región intergenica del Tn4401 se encontró que todos los 8 aislamientos correspondían a la isoforma b (Tn4401b). La pérdida de elementos del transposon se puede deber a fenómenos de recombinación con otros elementos genéticos; de acuerdo a los resultados, la estructura de este entorno se relaciona más con los denominados NTE_{KPC-I} - NTE_{KPC-II}.

Localización del gen *bla*_{KPC}

Para el análisis de la ubicación plasmídica o cromosomal del gen *bla*_{KPC-2}, se seleccionó un aislamiento de cada grupo clonal, y todos los policlonales. En total se realizó el análisis a 10 aislamientos. El análisis de S1/PFGE mostro que todos los aislamientos tenían múltiples plásmidos, con un tamaño entre <48.5 Kb y 300 Kb. Por CEU-1/PFGE e hibridación se encontró que el gen *bla*_{KPC-2} tenía una localización plasmídica en todos los aislamientos. En nueve aislamientos la sonda hibrido en un único plásmido de tamaño variable (<48.5 Kb, 50 Kb y 135 Kb) y en el aislamiento restante, la sonda hibrido en dos plásmidos de 60 Kb y 140 Kb (ver figura 11). Estos resultados son similares a lo reportado en *K. pneumoniae*. La localización de *bla*_{KPC} en *E. cloacae* complex en plásmidos, representa un gran problema debido a la mayor capacidad de diseminación que tienen estos elementos genéticos.

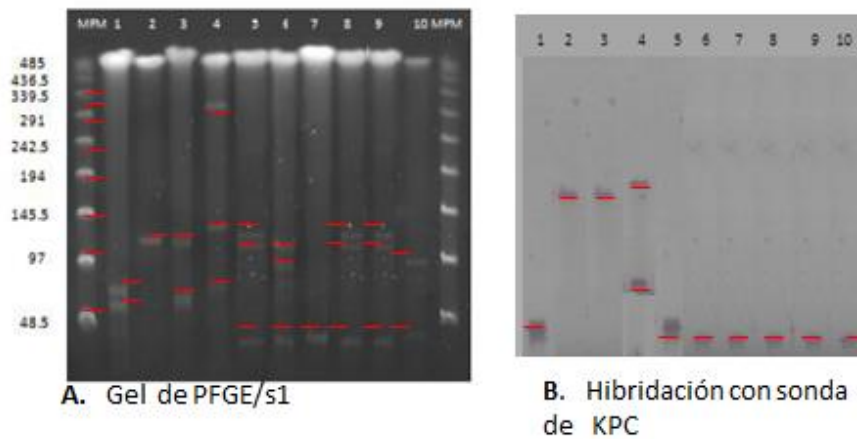
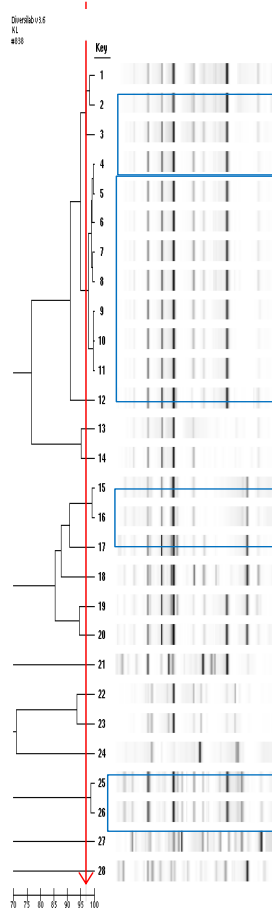


Figura 11. Localización del gen *bla*_{KPC-2} en aislamientos de *E. cloacae* complex. **A.** Resultado de la restricción con S1/PFGE. **B.** Hibridación con sondas específicas para el gen *bla*_{KPC}.

Análisis por MLST

Los resultados del análisis por MLST mostro 15 diferentes STs, de los cuales 1 ST (3,5%) se reportó por primera vez en este estudio (ST819) El ST510 fue el ST más frecuente (10/28, 36%), seguido por los ST200, ST63, ST54 y ST27 que fueron encontrados en dos aislamientos cada uno. Los otros STs encontrados en este estudio son el ST88, ST171, ST249, ST 264, ST414, ST711, ST712; y el ST182 y su SLV ST98.

Tabla 5. Tipificación molecular de aislamientos de *E. cloacae* complex



No aislamiento	Grupo clonal/rep-PCR	Ciudad	Año	Determinantes de resistencia	Entorno genetico	Tamaño del plasmido portador de <i>blaKPC</i> (Kb)	MLST
22	A1	MED	2009	<i>blaCTXM-15, blaTEM-1</i>			ST510
21		MED	2009	<i>blaTEM-1</i>			ST510
18		CLO	2011	<i>blaKPC-2, blaTEM-1, qnrB</i>		< 48.5	ST510
12	A2	CLO	2010	<i>blaKPC-2, blaTEM-1, qnrB</i>			ST510
17		CLO	2011	<i>blaKPC-2, blaTEM-1, qnrB</i>			ST510
7		CLO	2013	<i>blaKPC-2, blaCTX-M-12, blaTEM-1, qnrB</i>		< 48.5	ST264
14		PER	2010	<i>blaKPC-2, blaTEM-1, qnrB</i>			ST510
13		PER	2010	<i>blaKPC-2, blaTEM-1, qnrB</i>			ST510
11		CLO	2012	<i>blaKPC-2, blaTEM-1, qnrB</i>			ST510
16		CLO	2012	<i>blaKPC-2, blaTEM-1, qnrB</i>			ST510
10		CLO	2012	<i>blaKPC-2, blaTEM-1, qnrB</i>		< 48.5	ST182
5	A3	BMG	2011	<i>blaKPC-2, blaCTX-M-12, blaTEM-1, qnrB</i>	Tn4401b	< 48.5	ST88
25	A4	BMG	2011	<i>blaSHV-1</i>			ST819
6	A5	CLO	2009	<i>blaKPC-2</i>	Tn4401b	135	ST711
24	A6	BGT	2009	<i>blaCTX-M-12, blaTEM-1</i>			ST200
23		BGT	2009	<i>blaCTX-M-12, blaTEM-1</i>			ST200
19	A7	CLO	2012	<i>blaKPC-2, blaTEM-1, qnrB</i>			ST510
28	A8	PER	2010	-			ST63
9	A9	PAS	2011	<i>blaKPC-2, blaTEM-1</i>		< 48.5	ST171
1	A10	PER	2009	<i>blaKPC-2, qnrB</i>	Tn4401b	135	ST98
2	A11	PER	2009	<i>blaKPC-2, blaCTX-M-12, blaTEM-1</i>	Tn4401b	52	ST249
26	A12	NEV	2011	<i>blaCTX-M-12, blaTEM-1</i>			ST63
8	A13	CLO	2011	<i>blaKPC-2, blaSHV-1, qnrB</i>	Tn4401b	< 48.5	ST712
27	A14	PER	2012	<i>blaCTX-M-12, blaTEM-1, qnrA</i>			ST54
4	A15	CLO	2009	<i>blaKPC-2, blaTEM-1, qnrB</i>	Tn4401b		ST27
3		CLO	2009	<i>blaKPC-2, blaTEM-1, blaSHV-12, qnrB</i>	Tn4401b	140/60	ST27
20	A16	BGT	2009	<i>blaCTX-M-12, blaTEM-1, blaSHV-12, qnrB</i>			ST54
15	A17	BRQ	2010	<i>blaKPC-2, blaTEM-1, blaSHV-86</i>	Tn4401b		ST414

MED: Medellín, CLO: Cali, BMG: Bucaramanga, BGT: Bogotá, PER: Pereira, PAS: Pasto, NEV: Neiva, BRQ: Barranquilla. ETP: ertapenem, IMI: imipenem, MER: meropenem, DOR: doripenem, AK: amikacina, CIP: ciprofloxacina, POL: polimixina, TGC: tigeciclina.

Los ST27, ST88, ST182, ST264 y ST510 que es el más diseminado, están asociados al gen *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM-1} y *qnrB*, lo cual ha sido reportado previamente en algunos estudios (80). Esto podría sugerir que se han diseminado en un único plásmido. Los ST63 y ST200 portaban *bla*_{TEM-1} y *bla*_{CTX-M-12}.

El ST510 es el ST más prevalente. Este ST se observa circulando en tres de las ocho ciudades: Cali, Pereira y Medellín. Este ST aparece en aislamientos del 2009 hasta el 2013. Curiosamente dos aislamientos del 2009 de la ciudad de Medellín pertenecientes al ST510 no portan genes *bla*_{KPC}. Este gen apareció en aislamientos del 2010 aislados en la ciudad de Cali y Pereira; lo que podría sugerir una adquisición posterior de este mecanismo de resistencia asociado a este ST. Llama también la atención que todos los aislamientos pertenecientes a este ST no estaban asociado al Tn4401. En estos aislamientos solo se encontró la secuencia de inserción *IsKpn6* corriente abajo del gen de *bla*_{KPC}.

Los ST88, ST249, ST182 y su single locus variant (SLV) ST98 reportados en este estudio portadores de *bla*_{KPC} han sido previamente reportados en Europa asociados a otras betalactamasas (VIM, SHV y OXA-48); así como a hiperexpresión de AmpC (119). El ST171 fue reportado en los Estados Unidos asociado a *bla*_{KPC} igual que en nuestro estudio. Los dos aislamientos perteneciente al ST200 aislados en el 2009 en la misma ciudad no portaban carbapenemasas pero si BLEES tipo CTX-M-12. Este ST ha sido previamente reportado en Europa portando *bla*_{NDM} y CTX-M-15, enzimas encontradas también en Colombia, indicando la posibilidad de que este ST pueda sumarse a la diseminación de enzimas tipo NDM.

Al comparar los resultados entre rep-PCR y MLST, en la mayoría de los casos se observó el mismo ST por grupo clonal, excepto para el grupo A2 donde se identificaron tres diferentes STs (ST510, ST264 y ST182) (ver tabla 6). A los aislamientos del grupo A2 relacionados por rep-PCR y asociados principalmente al ST510 se les realizó PFGE para confirmar su relación clonal. Por esta

metodología se obtuvieron cinco pulsotipos (P1 – P5) quedando los ST182 y ST264 por fuera del grupo relacionado clonalmente. Cuando se comparó el análisis por PFGE con el método de rep-PCR, se encontró que PFGE tuvo más poder discriminatorio que el método basado en técnicas de PCR (ver figura 12).

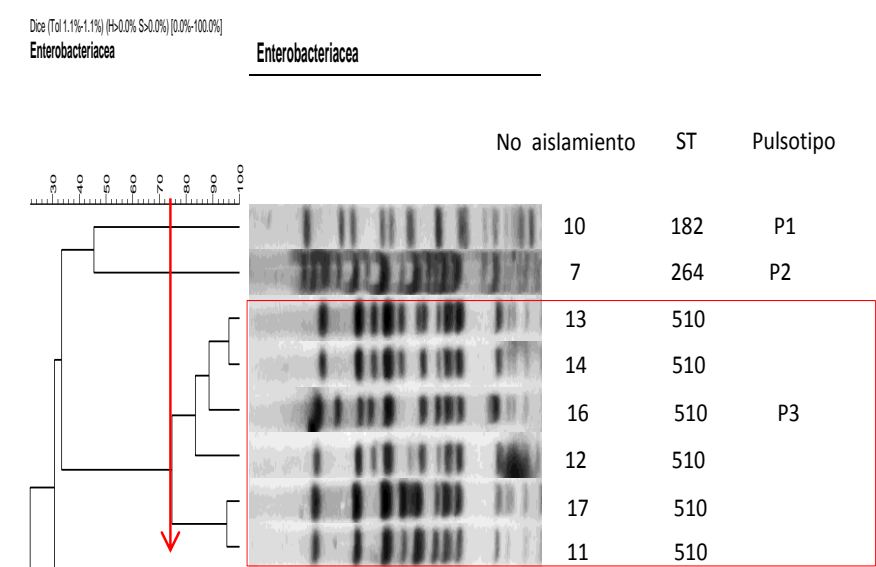


Figura 12. Análisis de *E. cloacae* por Electroforesis de campos pulsados (PFGE) y su tipo de secuencia (ST).

Relación filogenética por goeBURST

Para evaluar la relación filogenética de aislamientos de *E. cloacae complex* se utilizó goeBURST, un algoritmo diseñado específicamente para el manejo de datos obtenidos por MLST. El programa goeBURST genera gráficos que permiten observar las relaciones genéticas entre los aislamientos. De acuerdo a

esto, solo dos aislamientos están relacionados, el ST98 que es un *SLV* del ST182 (ver figura 13). Ninguno de los ST reportados está relacionado con los ST66, ST108, CC114 y CC78 los cuales se han asociado a la diseminación clonal de *E. cloacae* con resistencia a carbapenémicos en Europa e Israel (118,119).

El ST510 y el ST819, que fue un nuevo ST identificado en este estudio tienen un ancestro común. Ambos STs son *TLV* del ST50, pero no están relacionados entre ellos. El ST50 ha sido reportado previamente en China en aislamientos de *E. cloacae* complex resistentes a carbapenémicos conmutaciones en AmpC e hiperexpresión (120). Los dos STs que provienen del mismo ancestro común (ST50), se reportaron en distintas ciudades (ver figura 14). El ST510 se reportó en las ciudades de Cali, Medellín y Pereira; el ST819 en la ciudad de Bucaramanga.

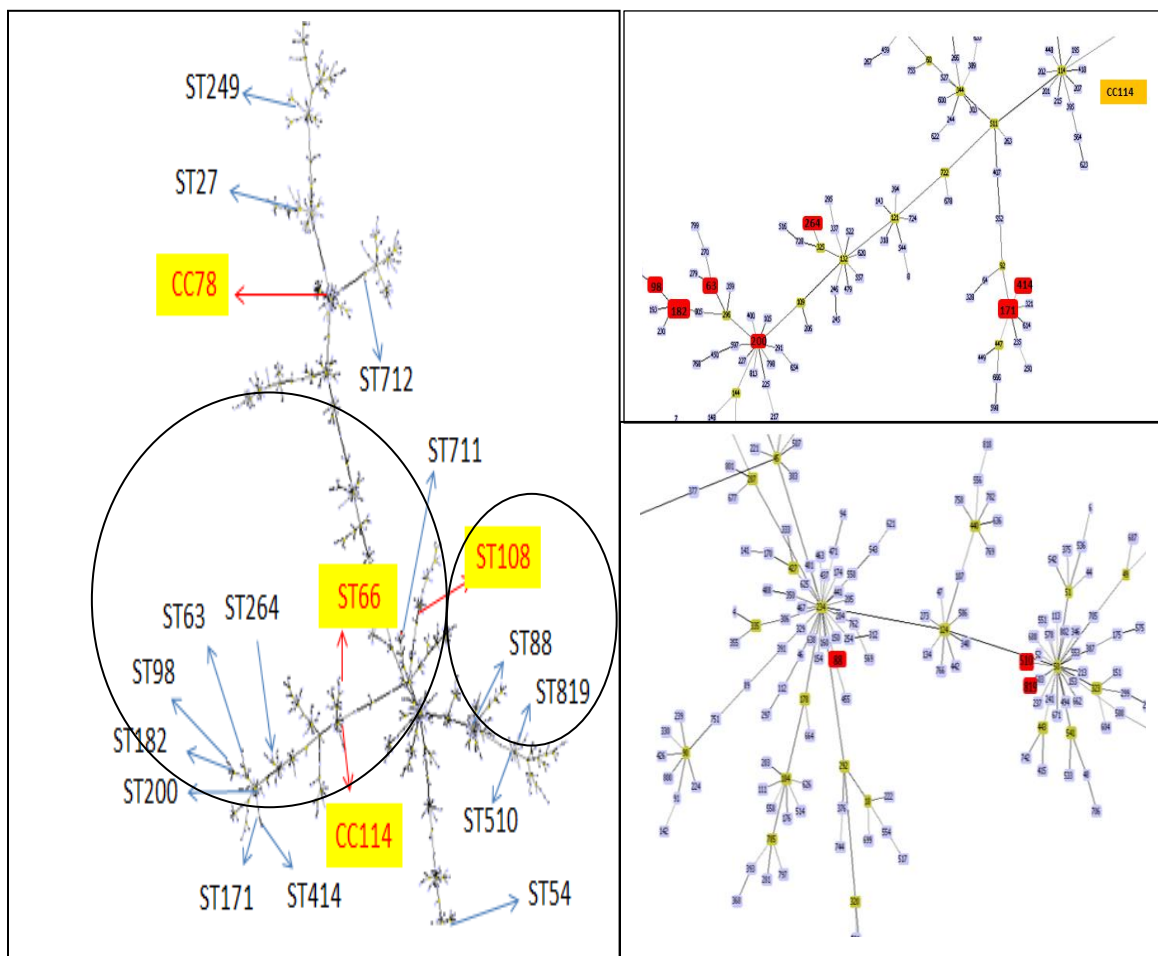


Figura 13. Distribución de los STs de 28 aislamientos de *E. cloacae* resistentes a carbapenémicos aislados en ocho ciudades de Colombia construido con los datos conocidos de los STs ($n=819$). Flecha roja: STs asociados a clones de alto riesgo. Flecha azul: STs reportados en este estudio.

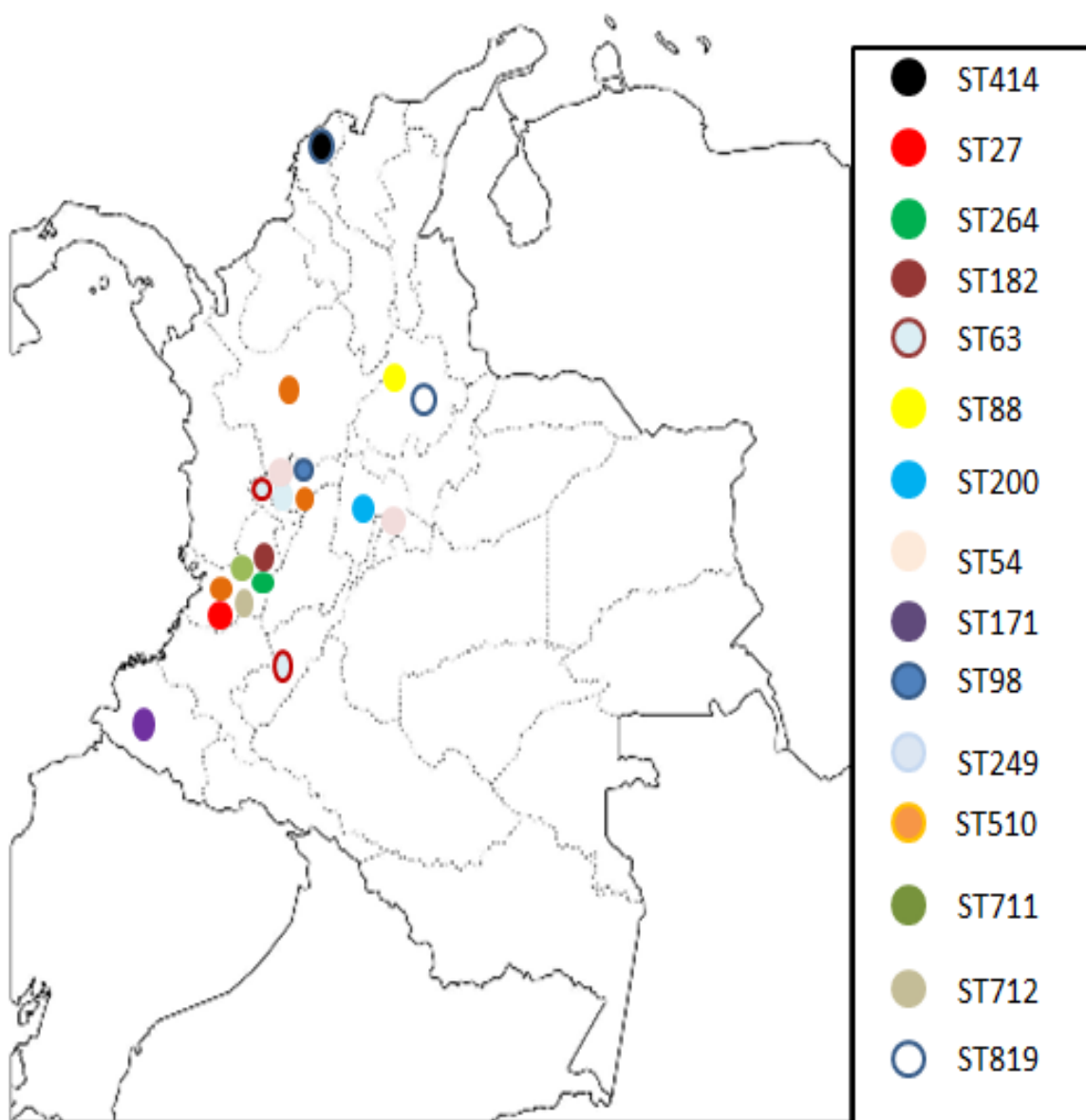


Figura 14. Identificación de MLST en aislamientos de *Enterobacter cloacae* complex en ocho ciudades de Colombia.

CONCLUSIONES

Los carbapenémicos son la opción terapéutica para el tratamiento de infecciones producidas por *E. cloacae* complex debido a la alta resistencia natural que presenta, al igual que la facilidad de adquirir otros determinantes de resistencia. Es así que el incremento de aislamientos resistentes a esos antibióticos puede tener un importante impacto clínico. La diseminación clonal de microorganismos MDR se reportan cada vez con más frecuencia indicando la necesidad de cambios en las prácticas de control de infecciones; implementar programas de vigilancia mediante detección de genes de resistencia y técnicas de tipificación como MLST podrían ayudar a detectar tempranamente la aparición de clones de alto riesgo.

Los reportes disponibles a la fecha sugieren que al igual que en *E. coli* y *K. pneumoniae*, la diseminación de *E. cloacae* con resistencia a carbapenémicos podría estar asociado a algunos STs y CC que aunque todavía no pueden denominarse clones de alto riesgo, si han llamado la atención por su potencial para llegar a serlo. Esto podría identificarse a medida que se realicen más estudios en diversas regiones geográficas. Ninguno de los ST identificados en este estudio pertenece a alguno de estos STs, sin embargo algunos de estos podrían tener el potencial para diseminarse rápidamente, Esto evidencia la importancia de implementar herramientas de vigilancia molecular que permitan identificarlos e implementar medidas para su contención.

En este estudio, a pesar de que la mayoría de los aislamientos de *E. cloacae* complex tenían una resistencia asociada al gen *bla_{KPC}*, se observa un número de aislamientos resistentes al menos a un carbapenémico por procesos no enzimáticos. Esto hace necesario implementar pruebas de tamizaje más confiables, que permitan excluir falsos positivos, muy comunes en este complejo

debido a la hiper-expresión de AmpC. La prueba de carba NP, ha demostrado tener una sensibilidad y especificidad cercanas al 100%, y se ve menos afectada por los falsos positivos, permitiendo identificar la presencia de carbapenemasas, e implementar medidas de control adecuadas como el uso adecuado de antibióticos y el aislamiento de contacto.

Igualmente se observó una alta variabilidad en la organización del Tn4401 en la mayoría de los aislamientos portadores de *bla*_{KPC}. Esto puede deberse a la gran capacidad de recombinación que tienen estos transposones, lo que se ha reportado previamente (47).

Este es el primer estudio realizado en América Latina con *E. cloacae* complex, y constituye un primer paso en la exploración de la estructura poblacional por medio de MLST en *E. cloacae* complex resistentes a carbapenémicos en Colombia. Esta técnica tiene un gran potencial que puede ser utilizado para el control y la prevención de infecciones

LIMITACIONES

Una limitación de este estudio es la escasa cantidad de muestras que se incluyeron. Igualmente la mayor parte de las muestras provienen de tres ciudades principalmente, lo que no permite extrapolar los resultados a todo el país.

REFERENCIAS

1. **Tom Frieden.** 2013. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
2. **Peleg, A. Y. and D. C. Hooper.** 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N.Engl.J.Med.* **362**:1804-1813. doi:362/19/1804 [pii];10.1056/NEJMra0904124 [doi].
3. **Glasner, C., B. Albiger, G. Buist, A. A. Tambic, R. Canton, Y. Carmeli, A. W. Friedrich, C. G. Giske, Y. Glupczynski, M. Gniadkowski, D. M. Livermore, P. Nordmann, L. Poirel, G. M. Rossolini, H. Seifert, A. Vatopoulos, T. Walsh, N. Woodford, T. Donker, D. L. Monnet, and H. Grundmann.** 2013. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro.Surveill* **18**.
4. **Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN** (2014) Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009–2011). *Diagn Microbiol Infect Dis* 78(4):443–448.
5. **Mathers, A. J., G. Peirano, and J. D. Pitout.** 2015. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin.Microbiol.Rev* **28**:565-591. doi:28/3/565 [pii];10.1128/CMR.00116-14 [doi].
6. **Vazquez, J. A. and S. Berron.** 2004. [Multilocus sequence typing: the molecular marker of the Internet era]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **22**:113-120. doi:13056892 [pii].
7. **van, B. A., P. T. Tassios, L. Dijkshoorn, S. Haeggman, B. Cookson, N. K. Fry, V. Fussing, J. Green, E. Feil, P. Gerner-Smidt, S. Brisse, and M. Struelens.** 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **13 Suppl 3**:1-46. doi:CLM1786 [pii];10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x [doi].

8. **Ruppe, E., P. L. Woerther, and F. Barbier.** 2015. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann.Intensive Care* **5**:61. doi:10.1186/s13613-015-0061-0 [doi].
9. **Alekshun, M. N. and S. B. Levy.** 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**:1037-1050. doi:S0092-8674(07)00311-X [pii]; 10.1016/j. cell.2007.03.004 [doi].
10. **Poole, K.** 2002. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr.Pharm.Biotechnol.* **3**:77-98.
11. **Li, X. Z., P. Plesiat, and H. Nikaido.** 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin.Microbiol.Rev* **28**:337-418. doi:28/2/337 [pii];10.1128/CMR.00117-14 [doi].
12. **Vila, J., S. Marti, and J. Sanchez-Cespedes.** 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J.Antimicrob.Chemother.* **59**:1210-1215. doi:dkl509 [pii];10.1093/jac/dkl509 [doi].
13. **Pages, J. M., C. E. James, and M. Winterhalter.** 2008. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat.Rev Microbiol.* **6**:893-903. doi:nrmicro1994 [pii];10.1038/nrmicro1994 [doi].
14. **Mingeot-Leclercq, M. P., Y. Glupczynski, and P. M. Tulkens.** 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:727-737.
15. **Bush K.** 2010. Bench-to-bedside review: The role of b-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care* **14**: 224.
16. **Suarez, C. and F. Gudiol.** 2009. [Beta-lactam antibiotics]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **27**:116-129. doi:S0213-005X(08)00032-3 [pii];10.1016/j.eimc.2008.12.001 [doi].
17. **Navarro, R. F., C. E. Miro, and O. B. Mirelis.** 2002. [Interpretive reading of the antibiogram of enterobacteria]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **20**:225-234. doi:13031076 [pii].

18. **Allen H. K., Donato J., Wang H., Cloud-Hansen K. A., Davies J., and Handelsman J.** Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*. Volume 8, April 2010, p251.
19. **Siroto, J., C. Chanal, A. Petit, D. Siroto, R. Labia, and G. Gerbaud.** 1988. *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae producing novel plasmid-mediated beta-lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: epidemiologic studies. *Rev Infect.Dis.* **10**:850-859.
20. **Bush, K.** 2010. Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr.Opin.Microbiol.* **13**:558-564. doi:S1369-5274(10)00133-5 [pii];10.1016/j.mib.2010.09.006 [doi].
21. **Winokur, P. L., Canton, R., Casellas, J. M., and Legakis N.** 2001. Variations in the Prevalence of Strains Expressing an Extended-Spectrum b-Lactamase Phenotype and Characterization of Isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *Clinical Infectious Diseases*; 32(Suppl 2):S94–103.
22. **Bonnet, R.** 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:1-14.
23. **Nicolas-Chanoine, M. H., J. Blanco, V. Leflon-Guibout, R. Demarty, M. P. Alonso, M. M. Canica, Y. J. Park, J. P. Lavigne, J. Pitout, and J. R. Johnson.** 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J.Antimicrob.Chemother.* **61**:273-281. doi:dkm464 [pii];10.1093/jac/dkm464 [doi].
24. **Woerther, P. L., C. Burdet, E. Chachaty, and A. Andremont.** 2013. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin.Microbiol.Rev* **26**:744-758. doi:26/4/744 [pii];10.1128/CMR.00023-13 [doi].
25. **Villegas, M. V., J. N. Kattan, M. G. Quinteros, and J. M. Casellas.** 2008. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. *Clin.Microbiol.Infect.* **14 Suppl 1**:154-158. doi:S1198-743X(14)60486-9 [pii];10.1111/j.1469-0691.2007.01869.x [doi].

26. **Ruiz, S. J., M. C. Montealegre, P. Ruiz-Garbajosa, A. Correa, D. F. Briceno, E. Martinez, F. Rosso, M. Munoz, J. P. Quinn, R. Canton, and M. V. Villegas.** 2011. First characterization of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clones causing community-onset infections in South America. *J.Clin.Microbiol.* **49**:1993-1996. doi:JCM.00045-11 [pii];10.1128/JCM.00045-11 [doi].
27. **Victor M.Blanco, Juan J.Maya, Adriana Correa, and Marcela Perenguez.** 2015. Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia . *Enferm Infecc Microbiol Clin*.
28. **Paterson D. L., and Bonomo R. A.,** 2005. Extended-Spectrum B-Lactamases: a Clinical Update, *Clinical Microbiology Reviews*, p. 657–686
29. **Philippon, A., G. Arlet, and G. A. Jacoby.** 2002. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**:1-11.
30. **Lister, P. D., D. J. Wolter, and N. D. Hanson.** 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin.Microbiol.Rev* **22**:582-610. doi:22/4/582 [pii];10.1128/CMR.00040-09 [doi].
31. **Chow, J. W., M. J. Fine, D. M. Shlaes, J. P. Quinn, D. C. Hooper, M. P. Johnson, R. Ramphal, M. M. Wagener, D. K. Miyashiro, and V. L. Yu.** 1991. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann.Intern.Med.* **115**:585-590.
32. **Jacoby, G. A.** 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin.Microbiol.Rev.* **22**:161-82, Table. doi:22/1/161 [pii];10.1128/CMR.00036-08 [doi].
33. **Nordmann, P., Dortet L. and Poirel L.** 2012. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, Vol. 18, No. 5

34. **Queenan, A. M. and K. Bush.** 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin.Microbiol.Rev.* **20**:440-58, table. doi:20/3/440 [pii];10.1128/CMR.00001-07 [doi].
35. **Bush, K. and G. A. Jacoby.** 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob.Agents Chemother.* **54**:969-976. doi:AAC.01009-09 [pii];10.1128/AAC.01009-09 [doi].
36. **Walther-Rasmussen, J. and N. Hoiby.** 2007. Class A carbapenemases. *J.Antimicrob.Chemother.* **60**:470-482. doi:dkm226 [pii];10.1093/jac/dkm226 [doi].
37. **Baraniak, A., R. Izdebski, M. Herda, J. Fiett, W. Hryniewicz, M. Gniadkowski, I. Kern-Zdanowicz, K. Filczak, and U. Lopaciuk.** 2009. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob.Agents Chemother.* **53**:4565-4567. doi:AAC.00436-09 [pii];10.1128/AAC.00436-09 [doi].
38. **Giani, T., M. M. D'Andrea, P. Pecile, L. Borgianni, P. Nicoletti, F. Tonelli, A. Bartoloni, and G. M. Rossolini.** 2009. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 Carbapenemase. *J. Clin. Microbiol.* **47**:3793-3794. doi:JCM.01773-09 [pii];10.1128/JCM.01773-09 [doi].
39. **Yan, J.J., W.C. Ko, and J.J. Wu.** 2001. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo-B-lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2368–2371.
40. **Pournaras, S., E. Protonotariou, E. Voulgari, I. Kristo, E. Dimitroulia, D. Vitti, M. Tsalidou, A. N. Maniatis, A. Tsakris, and D. Sofianou.** 2009. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J.Antimicrob.Chemother.* **64**:348-352. doi:dkp207 [pii];10.1093/jac/dkp207 [doi].
41. **Gao R, Hu Y, Li Z, Sun J, Wang Q, Lin J, Ye, H., Liu, F., Srinivas, S., Li, D., Zhu, B., Liu, Y., Tian, G., Feng, Y.** 2016. Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. *PLoS Pathog* 12(11): e1005957. doi:10.1371/journal.ppat.1005957.

42. **Yigit, H., A. M. Queenan, G. J. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J. W. Biddle, C. D. Steward, S. Alberti, K. Bush, and F. C. Tenover.** 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1151-1161. doi:10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001 [doi].
43. **Tzouvelekis, L. S., A. Markogiannakis, M. Psychogiou, P. T. Tassios, and G. L. Daikos.** 2012. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**:682-707. doi:25/4/682 [pii];10.1128/CMR.05035-11 [doi].
44. **Villegas, M. V., K. Lolans, A. Correa, C. J. Suarez, J. A. Lopez, M. Vallejo, and J. P. Quinn.** 2006. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2880-2882. doi:50/8/2880 [pii];10.1128/AAC.00186-06 [doi].
45. **Lopez, J. A., A. Correa, S. Navon-Venezia, A. L. Correa, J. A. Torres, D. F. Briceno, M. C. Montealegre, J. P. Quinn, Y. Carmeli, and M. V. Villegas.** 2011. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**:52-56. doi:S1198-743X(14)60913-7 [pii];10.1111/j.1469-0691.2010.03209.x [doi].
46. **Mojica, M. F., A. Correa, D. A. Vargas, J. J. Maya, M. C. Montealegre, L. J. Rojas, S. J. Ruiz, J. P. Quinn, and M. V. Villegas.** 2012. Molecular correlates of the spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Colombia. *Int. J. Antimicrob. Agents* **40**:277-279. doi:S0924-8579(12)00207-5 [pii];10.1016/j.ijantimicag.2012.05.006 [doi].
47. **Naas, T., G. Cuzon, M. V. Villegas, M. F. Lartigue, J. P. Quinn, and P. Nordmann.** 2008. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1257-1263. doi:AAC.01451-07 [pii];10.1128/AAC.01451-07 [doi].

48. **Cuzon, G., Naas,T., and Nordmann P.** 2011. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in blaKPC gene mobilization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 5370–5373
49. **Kitchel, B., J. K. Rasheed, A. Endimiani, A. M. Hujer, K. F. Anderson, R. A. Bonomo, and J. B. Patel.** 2010. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:4201-4207. doi:AAC.00008-10 [pii];10.1128/AAC.00008-10 [doi].
50. **Shen, P., Z. Wei, Y. Jiang, X. Du, S. Ji, Y. Yu, and L. Li.** 2009. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:4333-4338. doi:AAC.00260-09 [pii];10.1128/AAC.00260-09 [doi].
51. **Gomez, S. A., F. G. Pasteran, D. Faccone, N. Tijet, M. Rapoport, C. Lucero, O. Lastovetska, E. Albornoz, M. Galas, R. G. Melano, A. Corso, and A. Petroni.** 2011. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**:1520-1524. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03600.x [doi];S1198-743X(14)61870-X [pii].
52. **Naas, T., R. A. Bonnin, G. Cuzon, M. V. Villegas, and P. Nordmann.** 2013. Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**:1757-1762. doi:dkt094 [pii];10.1093/jac/dkt094 [doi].
53. **Chen, L., B. Mathema, K. D. Chavda, F. R. DeLeo, R. A. Bonomo, and B. N. Kreiswirth.** 2014. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol.* **22**:686-696. doi:S0966-842X(14)00193-0 [pii];10.1016/j.tim.2014.09.003 [doi].
54. **Mojica, M. F., R. A. Bonomo, and W. Fast.** 2016. B1-Metallo-beta-Lactamases: Where Do We Stand? *Curr. Drug Targets.* **17**:1029-1050. doi:CDT-EPUB-70773 [pii].
55. **Gupta, V.** 2008. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **17**:131-143. doi:10.1517/13543784.17.2.131 [doi].

56. **Osano, E., Y. Arakawa, R. Wacharotayankun, M. Ohta, T. Horii, H. Ito, F. Yoshimura, and N. Kato.** 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* **38**:71-78.
57. **Lauretti, L., M. L. Riccio, A. Mazzariol, G. Cornaglia, G. Amicosante, R. Fontana, and G. M. Rossolini.** 1999. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:1584-1590.
58. **Yum, J. H., D. Yong, K. Lee, H. S. Kim, and Y. Chong.** 2002. A new integron carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **42**:217-219. doi:S0732889301003522 [pii].
59. **Yong, D., M. A. Toleman, C. G. Giske, H. S. Cho, K. Sundman, K. Lee, and T. R. Walsh.** 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob.Agents Chemother.* **53**:5046-5054. doi:AAC.00774-09 [pii];10.1128/AAC.00774-09 [doi].
60. **Pellegrino, F. L., N. Casali, K. R. Dos Santos, S. A. Nouer, E. M. Scheidegger, L. W. Riley, and B. M. Moreira.** 2006. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain carrying bla(SPM) metallo-beta-lactamase detected in Rio de Janeiro, Brazil. *J.Chemother.* **18**:151-156. doi:10.1179/joc.2006.18.2.151 [doi].
61. **Poirel, L., J. M. Rodriguez-Martinez, N. N. Al, Y. J. Debets-Ossenkopp, and P. Nordmann.** 2010. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob.Agents Chemother.* **54**:2420-2424. doi:AAC.01456-09 [pii];10.1128/AAC.01456-09 [doi].
62. **Morfin-Otero, R., E. Rodriguez-Noriega, L. M. Deshpande, H. S. Sader, and M. Castanheira.** 2009. Dissemination of a bla(VIM-2)-carrying integron among

Enterobacteriaceae species in Mexico: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Microb.Drug Resist.* **15**:33-35. doi:10.1089/mdr.2009.0878 [doi].

63. **Pasteran, F., E. Albornoz, D. Faccione, S. Gomez, C. Valenzuela, M. Morales, P. Estrada, L. Valenzuela, J. Matheu, L. Guerriero, E. Arbizu, Y. Calderon, P. Ramon-Pardo, and A. Corso.** 2012. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *J.Antimicrob.Chemother.* **67**:1795-1797. doi:dks101 [pii];10.1093/jac/dks101 [doi].
64. **Villegas, M. V., C. J. Pallares, K. Escandon-Vargas, C. Hernandez-Gomez, A. Correa, C. Alvarez, F. Rosso, L. Matta, C. Luna, J. Zurita, C. Mejia-Villatoro, E. Rodriguez-Noriega, C. Seas, M. Cortesia, A. Guzman-Suarez, and M. Guzman-Blanco.** 2016. Characterization and Clinical Impact of Bloodstream Infection Caused by Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Seven Latin American Countries. *PLoS.One.* **11**:e0154092. doi:10.1371/journal.pone.0154092 [doi];PONE-D-15-53190 [pii].
65. **Montealegre, M. C., A. Correa, D. F. Briceno, N. C. Rosas, E. De La Cadena, S. J. Ruiz, M. F. Mojica, R. D. Camargo, I. Zuluaga, A. Marin, J. P. Quinn, and M. V. Villegas.** 2011. Novel VIM metallo-beta-lactamase variant, VIM-24, from a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Colombia. *Antimicrob.Agents Chemother.* **55**:2428-2430. doi:AAC.01208-10 [pii];10.1128/AAC.01208-10 [doi].
66. **Rojas, L. J., M. F. Mojica, V. M. Blanco, A. Correa, M. C. Montealegre, E. De La Cadena, J. J. Maya, R. D. Camargo, J. P. Quinn, and M. V. Villegas.** 2013. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Coharboring KPC and VIM Carbapenemases in Colombia. *Antimicrob.Agents Chemother.* **57**:1101-1102. doi:AAC.01666-12 [pii];10.1128/AAC.01666-12 [doi].
67. **Leonard, D. A., R. A. Bonomo, and R. A. Powers.** 2013. Class D beta-lactamases: a reappraisal after five decades. *Acc.Chem.Res.* **46**:2407-2415. doi:10.1021/ar300327a [doi].
68. **Carrer, A., L. Poirel, H. Eraksoy, A. A. Cagatay, S. Badur, and P. Nordmann.** 2008. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:2950-2954. doi:AAC.01672-07 [pii];10.1128/AAC.01672-07 [doi].

69. **Nordmann, P., T. Naas, and L. Poirel.** 2011. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg.Infect.Dis.* **17**:1791-1798. doi:10.3201/eid1710.110655 [doi].
70. **Vanegas JM and Ospina W.** 2016. First reported case of an OXA-48-producing isolate from a Colombian patient. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* **6**:67-68.
71. **Matsumura Y. & Pitout J. D.,** (2016): Recent advances in the laboratory detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, DOI: 10.1586/14737159.2016.1172964
72. **Wayne PA.** 2014. CLSI Performance standard of Antimicrobial Suscep-tibility Testing: Twenty-fourth International Supplement. CLSI Document M100-S24.
73. **Dortet, L., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2012. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. by using a biochemical test. *Antimicrob.Agents Chemother.* **56**:6437-6440. doi:AAC.01395-12 [pii];10.1128/AAC.01395-12 [doi].
74. **Tijet, N., D. Boyd, S. N. Patel, M. R. Mulvey, and R. G. Melano.** 2013. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob.Agents Chemother.* **57**:4578-4580. doi:AAC.00878-13 [pii];10.1128/AAC.00878-13 [doi].
75. **Cavaco, L. M., H. Korsgaard, G. Sorensen, and F. M. Aarestrup.** 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance due to qnrB5 and qnrS1 genes in Salmonella enterica serovars Newport, Hadar and Saintpaul isolated from turkey meat in Denmark. *J.Antimicrob.Chemother.* **62**:632-634. doi:dkn211 [pii];10.1093/jac/dkn211 [doi].
76. **Jacoby, G. A., J. Strahilevitz, and D. C. Hooper.** 2014. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol.Spectr.* **2**. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013 [doi].
77. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**:797-799. doi:S0140-6736(97)07322-4 [pii];10.1016/S0140-6736(97)07322-4 [doi].

78. **Kim, N. H., E. H. Choi, J. Y. Sung, C. E. Oh, H. B. Kim, E. C. Kim, and H. J. Lee.** 2013. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes and ciprofloxacin resistance in pediatric bloodstream isolates of Enterobacteriaceae over a 9-year period. *Jpn.J.Infect.Dis.* **66**:151-154. doi:DN/JST.JSTAGE/yoken/66.151 [pii].
79. **Jacoby, G. A., Walsh K. E., Mills D. M., Walker V. J., Oh H., Robicsek A., and Hooper D. C.** 2006. qnrB, Another Plasmid-Mediated Gen for Quinolone Resistance. Vol. 50, No. 4.
80. **Chmelnitsky, I., S. Navon-Venezia, J. Strahilevitz, and Y. Carmeli.** 2008. Plasmid-mediated qnrB2 and carbapenemase gene bla(KPC-2) carried on the same plasmid in carbapenem-resistant ciprofloxacin-susceptible *Enterobacter cloacae* isolates. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:2962-2965. doi:AAC.01341-07 [pii];10.1128/AAC.01341-07 [doi].
81. **Rice, L. B., L. L. Carias, R. A. Hutton, S. D. Rudin, A. Endimiani, and R. A. Bonomo.** 2008. The KQ element, a complex genetic region conferring transferable resistance to carbapenems, aminoglycosides, and fluoroquinolones in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:3427-3429. doi:AAC.00493-08 [pii];10.1128/AAC.00493-08 [doi].
82. **Lautenbach, E., B. L. Strom, W. B. Bilker, J. B. Patel, P. H. Edelstein, and N. O. Fishman.** 2001. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin.Infect.Dis.* **33**:1288-1294. doi:CID001702 [pii];10.1086/322667 [doi].
83. **Paterson, D. L., L. Mulazimoglu, J. M. Casellas, W. C. Ko, H. Goossens, G. A. Von, S. Mohapatra, G. M. Trenholme, K. P. Klugman, J. G. McCormack, and V. L. Yu.** 2000. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin.Infect.Dis.* **30**:473-478. doi:CID990983 [pii];10.1086/313719 [doi].
84. **Didelot, X. and M. C. Maiden.** 2010. Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends Microbiol.* **18**:315-322. doi:S0966-842X(10)00059-4 [pii];10.1016/j.tim.2010.04.002 [doi].

85. **Urwin, R. and M. C. Maiden.** 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* **11**:479-487. doi:S0966842X03002385 [pii].
86. **Maiden, M. C.** 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu.Rev Microbiol.* **60**:561-588. doi:10.1146/annurev.micro.59.030804.121325 [doi].
87. **Rogers, B. A., H. E. Sidjabat, and D. L. Paterson.** 2011. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J.Antimicrob.Chemother.* **66**:1-14. doi:dkq415 [pii];10.1093/jac/dkq415 [doi].
88. **Cooper, J. E. and E. J. Feil.** 2004. Multilocus sequence typing--what is resolved? *Trends Microbiol.* **12**:373-377. doi:10.1016/j.tim.2004.06.003 [doi];S0966842X04001350 [pii].
89. **Feil, E. J., B. C. Li, D. M. Aanensen, W. P. Hanage, and B. G. Spratt.** 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J.Bacteriol.* **186**:1518-1530.
90. **Francisco, A. P., M. Bugalho, M. Ramirez, and J. A. Carrico.** 2009. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC.Bioinformatics.* **10**:152. doi:1471-2105-10-152 [pii];10.1186/1471-2105-10-152 [doi].
91. **Davin-Regli, A. and J. M. Pages.** 2015. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol.* **6**:392. doi:10.3389/fmicb.2015.00392 [doi].
92. **Boucher, H. W., G. H. Talbot, J. S. Bradley, J. E. Edwards, D. Gilbert, L. B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, and J. Bartlett.** 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin.Infect.Dis.* **48**:1-12. doi:10.1086/595011 [doi].
93. **Paauw, A., M. P. Caspers, F. H. Schuren, M. A. Leverstein-van Hall, A. Deletoile, R. C. Montijn, J. Verhoef, and A. C. Fluit.** 2008. Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. *PLoS.One.* **3**:e3018. doi:10.1371/journal.pone.0003018 [doi].

94. **Marchaim, D., S. Navon-Venezia, M. J. Schwaber, and Y. Carmeli.** 2008. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1413-1418. doi:AAC.01103-07 [pii];10.1128/AAC.01103-07 [doi].
95. **Jaskulski M. R., Medeiros B. C., Borges J.V., Zalewskya R., M.E.C. Fonseca M.E.C., Marinowic D.R, Rochac M.P., Nodari P., Machado D.C.** 2013. Assessment of extended-spectrum β -lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents* 42: 76–79
96. **Yang, F. C., J. J. Yan, K. H. Hung, and J. J. Wu.** 2012. Characterization of ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese university hospital. *J.Clin.Microbiol.* **50**:223-226. doi:JCM.01263-11 [pii];10.1128/JCM.01263-11 [doi].
97. **Wei dai.** 2013. Characterization of carbapenemases, extended spectrum β -lactamases and molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Enterobacter cloacae* in a chinese hospital in chongqing. *Infections, Genetics and Evolution* **14**:1-7.
98. **Bratu, S., D. Landman, M. Alam, E. Tolentino, and J. Quale.** 2005. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:776-778. doi:49/2/776 [pii];10.1128/AAC.49.2.776-778.2005 [doi].
99. **Kiedrowski, L. M., D. M. Guerrero, F. Perez, R. A. Viau, L. J. Rojas, M. F. Mojica, S. D. Rudin, A. M. Hujer, S. H. Marshall, and R. A. Bonomo.** 2014. Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* isolates producing KPC-3, North Dakota, USA. *Emerg.Infect.Dis.* **20**:1583-1585. doi:10.3201/eid2009.140344 [doi].
100. **Lee, M. F., C. F. Peng, H. J. Hsu, and Y. H. Chen.** 2008. Molecular characterisation of the metallo- β -lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int.J.Antimicrob.Agents* **32**:475-480. doi:S0924-8579(08)00318-X [pii];10.1016/j.ijantimicag.2008.07.009 [doi].

101. **Luzzaro, F., J. D. Docquier, C. Colinon, A. Endimiani, G. Lombardi, G. Amicosante, G. M. Rossolini, and A. Toniolo.** 2004. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo-beta-lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:648-650.
102. **Panopoulou, M., E. Alepopoulou, A. Ikonomidis, A. Grapsa, E. Paspalidou, and S. Kartali-Ktenidou.** 2010. Emergence of VIM-12 in *Enterobacter cloacae*. *J. Clin. Microbiol.* **48**:3414-3415. doi:JCM.00843-10 [pii];10.1128/JCM.00843-10 [doi].
103. **Yan, J. J., W. C. Ko, C. L. Chuang, and J. J. Wu.** 2002. Metallo-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**:503-511.
104. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Detection of *Enterobacteriaceae* isolates carrying metallo-beta-lactamase. United States, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 59, 750. 2010.
105. **J. Teo, G. N. M. B.** 2012. Molecular characterization of NDM-1 producing *Enterobacteriaceae* isolates in Singapore hospitals. *Western Pacific Surveillance and Response Journal* **3**.
106. **Jamal, W., V. O. Rotimi, M. J. Albert, F. Khodakhast, P. Nordmann, and L. Poirel.** 2013. High prevalence of VIM-4 and NDM-1 metallo-beta-lactamase among carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J. Med. Microbiol.* **62**:1239-1244. doi:jmm.0.059915-0 [pii];10.1099/jmm.0.059915-0 [doi].
107. **Lascols, C., M. Hackel, S. H. Marshall, A. M. Hujer, S. Bouchillon, R. Badal, D. Hoban, and R. A. Bonomo.** 2011. Increasing prevalence and dissemination of NDM-1 metallo-beta-lactamase in India: data from the SMART study (2009). *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:1992-1997. doi:dkr240 [pii];10.1093/jac/dkr240 [doi].

108. **Rasheed, J. K., B. Kitchel, W. Zhu, K. F. Anderson, N. C. Clark, M. J. Ferraro, P. Savard, R. M. Humphries, A. J. Kallen, and B. M. Limbago.** 2013. New Delhi metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae, United States. *Emerg.Infect.Dis.* **19**:870-878. doi:10.3201/eid1906.121515 [doi].
109. **Dimude, J. U. and S. G. Amyes.** 2013. Molecular characterisation and diversity in *Enterobacter cloacae* from Edinburgh and Egypt carrying bla(CTX-M-14) and bla(VIM-4) beta-lactamase genes. *Int.J.Antimicrob.Agents* **41**:574-577. doi:S0924-8579(13)00072-1 [pii];10.1016/j.ijantimicag.2013.02.012 [doi].
110. **Potron, A., L. Poirel, E. Rondinaud, and P. Nordmann.** 2013. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro.Surveill* **18**.
111. **Fernandez, J., I. Montero, O. Martinez, A. Fleites, L. Poirel, P. Nordmann, and M. R. Rodicio.** 2015. Dissemination of multiresistant *Enterobacter cloacae* isolates producing OXA-48 and CTX-M-15 in a Spanish hospital. *Int.J.Antimicrob.Agents* **46**:469-474. doi:S0924-8579(15)00270-8 [pii];10.1016/j.ijantimicag.2015.07.003 [doi].
112. **Adler A, Solter E, Masarwa S, Miller-Roll T, Abu-Libdeh B, Khammash H, et al.** Epidemiological and microbiological characteristics of an outbreak caused by OXA-48-producing Enterobacteriaceae in a neonatal intensive care unit in Jerusalem, Israel. *J Clin Microbiol* 2013;51:2926–30.
113. **Guillard T,Cholley P,Limelette A, Hocquet D, Matton L, Guyeux C, Lebreil A-L, Bajolet O, Brasme L, Madoux J, Vernet-Garnier V, Barbe C, Bertrand X and de Champs C.** 2015. Fluoroquinolone Resistance Mechanisms and population structure of *Enterobacter cloacae* non-susceptible to Ertapenem in North-Eastern France. *Front. Microbiol.* **6**:1186. doi:10.3389/fmicb.2015.01186
114. **Jacoby, G. A., K. E. Walsh, D. M. Mills, V. J. Walker, H. Oh, A. Robicsek, and D. C. Hooper.** 2006. qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* **50**:1178-1182. doi:50/4/1178 [pii];10.1128/AAC.50.4.1178-1182.2006 [doi].

115. **Zhao, X., X. Xu, D. Zhu, X. Ye, and M. Wang.** 2010. Decreased quinolone susceptibility in high percentage of *Enterobacter cloacae* clinical isolates caused only by Qnr determinants. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **67**:110-113. doi:S0732-8893(09)00509-4 [pii];10.1016/j.diagmicrobio.2009.12.0
116. **Strahilevitz, J., D. Engelstein, A. Adler, V. Temper, A. E. Moses, C. Block, and A. Robicsek.** 2007. Changes in qnr prevalence and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. collected from 1990 to 2005. *Antimicrob.Agents Chemother.* **51**:3001-3003. doi:AAC.00256-07 [pii];10.1128/AAC.00256-07 [doi].
117. **Miyoshi-Akiyama, T., K. Hayakawa, N. Ohmagari, M. Shimojima, and T. Kirikae.** 2013. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS.One.* **8**:e66358. doi:10.1371/journal.pone.0066358 [doi];PONE-D-13-14248 [pii].
118. **Girlich, D., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2015. Clonal distribution of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae*. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **81**:264-268. doi:S0732-8893(15)00004-8 [pii];10.1016/j.diagmicrobio.2015.01.003 [doi].
119. **Izdebski, R., A. Baraniak, M. Herda, J. Fiett, M. J. Bonten, Y. Carmeli, H. Goossens, W. Hryniewicz, C. Brun-Buisson, and M. Gniadkowski.** 2015. MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*. *J.Antimicrob.Chemother.* **70**:48-56. doi:dku359 [pii];10.1093/jac/dku359 [doi].
120. **Cao Xiao-Li, Cheng Li, Zhang Zhi-Feng, Ning Ming-Zhe, Zhou Wan-Qing, Zhang Kui, and Shen Han.** *Microbial Drug Resistance.* January 2017, 23(1): 83-89. doi:10.1089/mdr.2015.0128.
121. **Huang Ling-Fu, Lee Chao-Tai, Su Lin-Hui, and Chang Chin-Lu.** *Microbial Drug Resistance.* January 2017, 23(1): 1-7. doi:10.1089/mdr.2015.0311.
122. **Ahn, C., A. Syed, F. Hu, J. A. O'Hara, J. I. Rivera, and Y. Doi.** 2014. Microbiological features of KPC-producing *Enterobacter* isolates identified in a U.S. hospital system. *Diagn.*

Microbiol. Infect. Dis. **80**:154-158.doi:S0732-8893(14)00255-7 [pii]; 10.1016/j.diagmicrobio.2014.06.010 [doi].

123. **Magiorakos, A. P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, and D. L. Monnet.** 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin.Microbiol.Infect. **18**:268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x [doi];S1198-743X(14)61632-3 [pii].
124. **D. M. Livermore.** 2012. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram Negative Pathogens. korean j intern med; 27:128-142 <http://dx.doi.org/10.3904/kjim.2012.27.2.128>
125. **Hernandez-Gomez, C., V. M. Blanco, G. Motoa, A. Correa, M. Vallejo, and M. V. Villegas.** 2014. Evolution of antimicrobial resistance in Gram negative bacilli from intensive care units in Colombia. Biomedica. **34 Suppl 1**:91-100. doi:S0120-41572014000500011 [pii];10.1590/S0120-41572014000500011 [doi].
126. **Correa A, del Campo R, Perenguez M, Blanco VM, Rodríguez-Baños M, Perez F, Maya JJ, Rojas L, Cantón R, Arias CA, Villegas MV.** 2015. Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. Antimicrob Agents Chemother 59:2421–2425. doi:10.1128/AAC.03926-14.
127. **Rice, L. B.** 2010. Progress and challenges in implementing the research on ESKAPE pathogens. Infect.Control Hosp.Epidemiol. **31 Suppl 1**:S7-10. doi:10.1086/655995 [doi].
128. **Anton Y. Peleg, M.B., B.S., M.P.H. and David C. Hooper, M.D.** Hospital-acquired infections due to gramnegative bacteria. N Engl J Med 2010;362:1804–1813.
129. **Priyanka Banerjee, Tavleen Jaggi, Mehvash Haider, Bibhabati mishra, Archana thakur.** 2014. Prevalence of Carbapenemases and Metallo-β-lactamases in Clinical Isolates of

Enterobacter Cloacae. Journal of Clinical and Diagnostic Research. Vol-8(11): DM01-DM02

130. **EUCAST**. European Antimicrobial Resistance Surveillance (EARS-Net) 2013. 29-12-2014.
Ref Type: Report
131. **Cattoir, V., L. Poirel, V. Rotimi, C. J. Soussy, and P. Nordmann**. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. J.Antimicrob.Chemother. **60**:394-397. doi:dkm204 [pii];10.1093/jac/dkm204 [doi].
132. **Pasteran, F., T. Mendez, L. Guerriero, M. Rapoport, and A. Corso**. 2009. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. J. Clin. Microbiol. 47:1631–1639.
133. **Babouee, F. B., M. J. Ellington, K. L. Hopkins, J. F. Turton, M. Doumith, R. Loy, P. Staves, V. Hinic, R. Frei, and N. Woodford**. 2016. Association of Novel Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphisms in ampD with Cephalosporin Resistance and Phylogenetic Variations in ampC, ampR, ompF, and ompC in Enterobacter cloacae Isolates That Are Highly Resistant to Carbapenems. Antimicrob.Agents Chemother. **60**:2383-2390. doi:AAC.02835-15 [pii];10.1128/AAC.02835-15 [doi]

C-078



Molecular characterization of *Enterobacter cloacae* complex harboring *bla*_{KPC} in Colombia

Elsa De La Cadena¹, Juan Sebastian Muñoz¹, Adriana Correa¹, Federico Perez^{2,3}, Christian Hernandez¹, Fernando Rosso⁴, Carmen Llanos⁵, Luis Uribe⁶, Martin Muñoz⁷, Marco Solarte⁸, Lorena Matta⁹, Roberto Viau^{2,3}, Laura Rojas^{2,3}, Robert A. Bonomo^{2,3} and Maria Virginia Villegas¹

¹ Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), Cali, Colombia, ² Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, USA, ³ Louis Stokes Cleveland VA Medical Center, Cleveland, USA, ⁴ Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia, ⁵ Hospital Universitario San Jorge, Pereira, Colombia, ⁶ Fundación Cardiovascular, Bucaramanga, Colombia, ⁷ Centro Médico Imbanaco, Cali, Colombia, ⁸ Hospital Departamental de Nariño, Pasto, Colombia, ⁹ Clínica Universitaria Rafael Uribe Uribe, Cali, Colombia



CIDEIM
marivirginiavillegas@gmail.com
(+57) 5552184
Cleveland, VA
federico.perez@va.gov
robert.bonomo@va.gov
216 791 3800 x 4845

ABSTRACT

Background: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) is one of the most prevalent carbapenemases worldwide. We previously described the molecular characterization and dissemination of *Klebsiella pneumoniae* (Kpn) harboring *bla*_{KPC} in Colombia. In contrast, carbapenem resistance due to the presence of *bla*_{KPC} has not been studied despite its recent emergence as a frequent hospital pathogen causing multiple infections in Colombia. The aim of this study was to characterize the genetic background of *E. cloacae* isolates harboring *bla*_{KPC} in the country.

Methods: Between 2009 and 2013, 30 *E. cloacae* isolates harboring *bla*_{KPC} were gathered in the Colombian bacterial resistance strain collection. 19 *E. cloacae* isolates from 7 hospitals of the 5 major cities were selected at CIDEIM. All selected isolates underwent CLSI-approved broth microdilution method (BMD) for antimicrobial susceptibility. Then they were characterized for *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{TEM} using qPCR; amplification and sequencing of *bla*_{KPC} gene was also done by PCR. Molecular fingerprinting was performed by rep-PCR (Diversilab). Isolates with a similarity of >95% were considered clonally related.

Results: The 19 *E. cloacae* isolates exhibited variable ranges of MIC values for the carbapenems: meropenem (4-64 µg/ml), imipenem (2-64 µg/ml), and doripenem/imipenem (1-64 µg/ml). All isolates were susceptible to piperacillin; 17/19 were susceptible to polymyxin. KPC-2 was the only carbapenemase found in all the isolates. Characterization of the genetic environment of the *bla*_{KPC} gene suggested that seven isolates were associated with the *bla*_{KPC} Tn4401. Different genetic structure of the Tn4401 was found. Clonal analysis revealed three clones, each one with different genetic variability for the Tn4401 structure. 19 medical records were reviewed; three patients died within 30 days of admission.

Conclusion: This early "snapshot" of the molecular epidemiology and dissemination of *bla*_{KPC} in Colombia suggests that the dissemination of this resistance determinant is following a different pattern when compared to *bla*_{KPC} in Kpn. The clonal diversity, different Tn4401 isoforms, and wide range of susceptibility and resistance suggest a complex genetic background is evolving. The impact of *bla*_{KPC} on mortality rate merits careful attention.

BACKGROUND

- Enterobacter cloacae* complex, which is part of the *Enterobacteriaceae* family, is a well-known cause of healthcare-associated infections and is responsible for a great diversity of clinical syndromes [2].
- While still considered rare, the emergence of carbapenem-resistant *E. cloacae* is of grave concern due to its increasing frequency and potential for widespread dissemination as a nosocomial pathogen [2-3].
- Carbapenem-resistance in *E. cloacae* can be mediated by changes in outer membrane proteins and production of cephalosporinases; however, there is increased recognition of carbapenem-resistance due to β -lactamases with carbapenemase activity, such as KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), NDM (New Delhi metallo- β -lactamase), OXA-48 (a class D β -lactamase) and VIM (Verona-integron-borne metallo- β -lactamase).
- KPC remains as one of the world's leading causes of carbapenemase-mediated resistance in *Enterobacteriaceae*, especially among *Klebsiella pneumoniae* where it is associated with the dissemination of "high-risk" clones belonging to sequence type (ST) 258 [1].
- Tn4401, a Tn3-based transposon, is important for the successful dissemination of KPC among different bacterial species. Moreover, its isoforms (a, b and c) are associated with different expression profiles, highlighting the importance of characterizing the *bla*_{KPC} genetic background [4].
- In this study, we re-evaluated the susceptibility to carbapenems, determine the genetic similarity, define the Tn4401 background, and examine the clinical outcome associated with 19 KPC-producing *E. cloacae* isolates from 5 Colombian cities gathered through CIDEIM's Hospital-acquired Infection / Bacterial Resistance National Surveillance Network.

METHODS

Phenotypic characterization: Species identification was confirmed using Vitek 2 (BioMérieux). Antibiotic susceptibility testing was performed using a broth microdilution method according to CLSI guidelines (TREK Diagnostic systems).
Molecular Characterization: PCR, and sequencing was used to screen for β -lactamase genes with carbapenemase activity: *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-48} and *bla*_{TEM}.
Genetic relatedness was assessed by analysis of repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) using the Diversilab platform.
A representative isolate from each rep-PCR type was selected for further molecular characterization. A PCR mapping approach was used to study the genetic environment of *bla*_{KPC} gene.
S1 nuclease/I-CatI digestions and hybridizations with probes for *bla*_{KPC} were used to study the location of the β -lactamase genes in the plasmid or chromosome.
Clinical outcomes of infection: The underlying clinical characteristics and outcomes of patients with carbapenem-resistant *E. cloacae* were investigated through retrospective chart review.

RESULTS

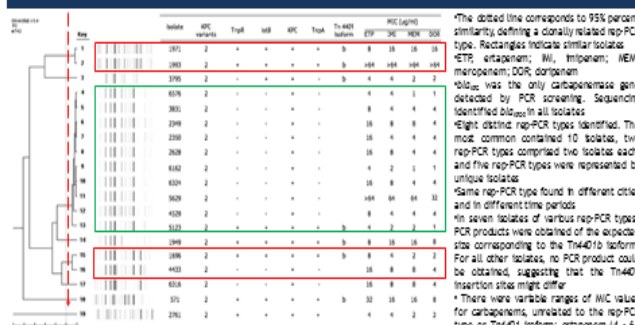


Figure 1. Genetic similarity among *Enterobacter cloacae* according to rep-PCR, MIC to carbapenems, type of carbapenemase, genetic environment and Tn4401 isoform

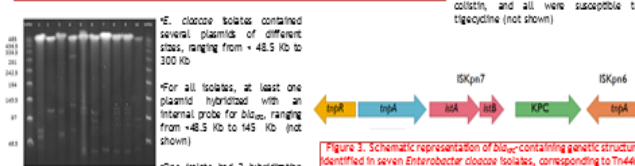


Figure 2. Plasmid size determination by S1 nuclease digestion coupled with pulsed field gel electrophoresis

Table. Clinical characteristics and outcomes of nine patients infected with KPC-producing *Enterobacter cloacae*

Study Code	Age	Underlying diagnosis	Type of infection	Charlson index	MCabe score	Pitt bacteremia score	MICU transfer	Outcome	Mortality attributable to infection with KPC-producing <i>E. cloacae</i>
571	57 years	Health care associated pneumonia	Secondary bacteremia	1	1	4	Yes	Deceased 2 days after infection	*Two of the deaths and three infections occurred in pediatric patients, including two infants
6576	7 months	Hemophagocytic syndrome	Secondary bacteremia	0	3	0	Yes	Deceased 6 days after infection	
6316	13 years	Acute lymphoblastic leukemia	Primary bacteremia	2	3	2	Yes	Deceased 2 days after infection	
5629	72 years	Traumatic brain injury and subarachnoid hemorrhage	Pneumonia	0	3	4	Yes	Deceased 21 days after infection	*Patients who survived infection experienced prolonged length of stay
3795	9 months	Intestinal volvulus	Secondary bacteremia	0	1	3	Yes	Discharged 7 days after infection	*There does not appear to be any association between rep-PCR type or Tn4401 isoform and the type of infection or outcome
3831	42 years	Peripheral vascular disease	Skin and soft tissue	1	1	n/a	No	Discharged 43 days after infection	
4529	61 years	Aortic dissection	Secondary bacteremia	1	3	3	Yes	Discharged 24 days after infection	
6324	79 years	Prostate cancer	Urinary tract	8	2	0	No	Discharged 20 days after infection	
1696	43 years	Liver abscess	Secondary bacteremia	0	1	0	n/a	Discharged 27 days after infection	

CONCLUSIONS

- Here we present an early "snapshot" of the molecular epidemiology and clinical impact of KPC-producing *E. cloacae* in Colombia.
- KPC-2 is the predominant carbapenemase associated with carbapenem resistance among *E. cloacae* isolates from Colombia.
- Genetic typing with rep-PCR suggests the presence of several clones *E. cloacae*, with a predominant clone that is found in several cities (Cali, Bucaramanga and Pereira).
- Even among genetically related *E. cloacae*, as defined by rep-PCR, *bla*_{KPC} is found in various complex genetic environments, with different plasmid profiles and Tn4401 isoforms. This feature, along with potential changes in outer membrane proteins, may explain the wide range of carbapenem MICs observed among *E. cloacae* isolates.
- Although Tn4401 isoform b was identified in seven isolates, a Tn3 transposon could not be identified at the source of *bla*_{KPC} in the majority of isolates.
- The impact of *bla*_{KPC}-harboring *E. cloacae* on pediatric patients, with infections associated with a high rate of mortality, merits careful attention.
- Together, these observations regarding the molecular epidemiology and outcomes of *bla*_{KPC}-harboring *E. cloacae* suggests that its pattern of dissemination and clinical impact may differ from those of KPC-producing *K. pneumoniae*.

REFERENCES

- Alvarado-Llano L, Patel L, Bonomo RA, Schneider H, Salas C, Cornish H, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2012;12(10):954-964.
- Alvarado-Llano L, Goto S, Barlet L, Brandes-Schaefer J, Brandes-Schaefer J, Brandes-Schaefer J, et al. Antimicrobial resistance patterns associated with health care-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2007-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2012;137(1):1-14.
- Claessens D, Vlastakis S, Koutoukou A. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in *bla*_{KPC} gene mobilization. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):3270-3274.
- Sharma S, Ramesh A, Zolotarev L, Hager M, Jorgensen JC, Bonomo RA, et al. Genetic factors associated with *bla*_{KPC} gene mobilization in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):3275-3277.
- Bonomo RA, Hershberg R, Tarrand P. A general method for detecting and cloning large plasmids. *Anal Biochem*. 1976;72(4):235-40.

Acknowledgments

We thank the Colombian Hospital Resistance Study Group. The contribution of this research has been possible thanks to the support of research reported to this presenter's Department of Veterans Affairs Research and Development under award number R010075, 1U01-10 Veterans Research, Education and Clinical Center, by the National Institute of Health and Infectious Diseases (NIH) of the National Institutes of Health (NIH) under award number R01AI072116, R01AI072116, and by the National Center for Research Resources under award number 1U01RR000001. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the Department of Veterans Affairs or the National Institutes of Health.

